

**Vergleichende Untersuchungen über die
Plasmidverteilung bei Escherichia coli-Stämmen
von gesunden und durchfallkranken Hunden
sowie von Hundebesitzern**

Ulrike Wastlhuber

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin
der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

Vergleichende Untersuchungen über die Plasmidverteilung bei
Escherichia coli-Stämmen von gesunden und durchfallkranken
Hunden sowie von Hundebesitzern.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität
München

von
Ulrike Wastlhuber
aus
München
München 1987

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr
Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Klee

Tag der Promotion:

26. Februar 1988

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Schrifttum</u>	2
2.1.	<u>Definitionen</u>	2
2.1.1.	Plasmid.....	2
2.1.2.	Konjugation.....	3
2.1.3.	Mobilisation.....	3
2.1.4.	Transposone.....	3
2.2.	<u>Virulenzplasmide bei</u> <u>darmpathogenen E. coli-Keimen</u>	4
2.2.1.	Grundlagen.....	4
2.3.	<u>Adhäsionsplasmide</u>	5
2.4.	<u>Enterotoxinplasmide</u>	8
2.4.1.	ETEC.....	8
2.4.2.	EPEC.....	10
2.4.3.	EHEC.....	11
2.5.	<u>Hämolysinplasmide</u>	11
2.6.	<u>Invasionsplasmide</u>	12
3.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	17
3.1.	<u>Material und Methoden</u>	17
3.1.1.	Herkunft der E. coli-Stämme.....	17
3.1.2.	Anzüchtung und Isolierung E.coli-Stämme.....	17

3.1.3.	Plasmiddarstellung (modifiziert nach Birnboim und Doly 1979).....	18
3.1.4.	Elektrophorese.....	19
3.1.5.	Bestimmung der Plasmidgrößen.....	19
3.1.6.	Toxinnachweis.....	20
3.1.6.1.	Baby-Maus-Test (nach Dean et al., 1972).....	20
3.1.6.2.	Darmligaturtest.....	20
3.2.	<u>Ergebnisse</u>	25
3.2.1.	Vorkommen und Größenverteilung von Plasmiden bei caninen E.coli-Stämmen.....	25
3.2.2.	Vergleich der Plasmidverteilung zwischen E.coli-Stämmen gesunder und durchfallkranker Hunde.....	30
3.2.3.	Vergleich der Plasmidmuster bei E.coli-Stämmen aus Stuhl- bzw. Kotproben durchfallkranker Hunden und Hundebesitzer.....	35
3.2.4.	Bildteil mit Legende zu den Abbildungen.....	38
4.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	43
5.	<u>Zusammenfassung</u>	48
6.	<u>Summary</u>	49
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	50
8.	<u>Anhang</u>	63

1. Einleitung

Die molekulare Epidemiologie gewinnt in der Bakteriologie eine immer größere Bedeutung. So sind auch die Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung pathogener E.coli-Stämme in ein neues Stadium getreten. Dabei hat sich die Plasmidanalyse mittels DNS-Hybridisierung inzwischen allgemein bewährt.

Bei den Durchfallkrankheiten der Hunde sind in den letzten Jahren enterotoxische E.coli-Stämme als kausale Erreger isoliert worden. Epidemiologische Untersuchungen über die Verbreitung dieser Erreger wurden bisher nur in relativ begrenzten Regionen durchgeführt. Um die Bedeutung der enterotoxischen E.coli-Keime bei Hunden abzuschätzen, sind aber überregionale Untersuchungen notwendig. Eine Ausdehnung auf die Hundebesitzer könnte zudem abklären, inwieweit eine Übertragung dieser E.coli-Stämme vom Hund auf den Menschen oder umgekehrt möglich ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, Grundlagen für epidemiologische Untersuchungen mittels Plasmidbestimmung zu schaffen. Dazu wurde in einem ersten Versuchsabschnitt überprüft, welche Plasmide bzw. welche typischen Plasmidmuster bei E.coli-Stämmen aus Hunden vorkommen und ob sich E.coli-Keime, die von durchfallkranken oder gesunden Hunden stammten, im Plasmidmuster unterscheiden. In einem zweiten Versuchsabschnitt wurden bei E.coli-Stämmen von Hunden und deren Besitzern die Plasmidmuster verglichen, um eventuelle Übertragungswege nachweisen zu können.

2. Schrifttum

2.1. Definitionen

2.1.1. Plasmid

Das genetische Material von Bakterien findet man a) in den an die Zellwand assoziierten Chromosomen und b) in der im Plasma vorliegenden DNS (Plasmid). Plasmide liegen als kreisförmige doppelsträngige DNS-Moleküle in einfacher Ringform (OC = open circles) oder in verdrehter Form (CCC = covalently closed circles) vor. Für den normalen Stoffwechsel der Wirtszelle sind Plasmide nicht erforderlich. Sie können als extrachromosomale Elemente ihre Kopienzahl selbständig (high copy plasmids) oder nur von dem Chromosom abhängig (low copy plasmids) bestimmen (Clowes, 1972).

Die sog. "high copy plasmids" können in bis zu 20-facher Ausführung in der Zelle vorliegen, wobei ihre Replikationssteuereinheit höchstens 2000 Basenpaare ($1,47 \times 10^3$ Bp = 1 Mega-Dalton) umfaßt. Die Replikationssteuereinheit setzt sich aus vier Elementen zusammen. Am Replikationsursprung codiert das Replikatorgen eine Initiatorsubstanz (Protein). Zwei Genbereiche sind für die Kopienanzahl (Repressorgen) und die Verteilung auf die Tochterzellen zuständig (Novick, 1980; Clowes, 1972; Lebeck, 1975). "Low-copy plasmids" benötigen nur einen Replikationsursprung, da sie die Initiatorsubstanz und das Repressorgen vom Chromosom erhalten. Damit hängen "low copy plasmids" in ihrer Kopienzahl von Chromosom ab und kommen meist nur einmal in der Zelle vor.

Plasmide können auch in verschiedene Inkompatibilitätsgruppen eingeteilt werden, wobei Plasmide aus einer Gruppe nicht gleichzeitig in einer Zelle vorkommen können. Inner-

halb der Inkompatibilitätsgruppen wird eine enge Verwandtschaft oder ein gemeinsamer Ursprung vermutet.

Als Episom bezeichnet man dagegen eine DNS, die sich sowohl unabhängig (extrachromosomal) als auch integriert im Wirtschromosom vervielfachen kann (Clowes, 1972; Novick, 1980).

2.1.2. Konjugation

Der Austausch von Genmaterial zwischen zwei Bakterien durch zellulären Kontakt wird als Konjugation bezeichnet. Um diesen zu ermöglichen, müssen Konjugativ-Pili auf der Zellwand vorhanden sein. Diese Oberflächenfortsätze zum Gen-Austausch werden nur von Bakterien ausgebildet, die konjugative Plasmide enthalten und damit zum Transfer von DNS fähig sind. Die Gene für die Konjugation nehmen ca. ein Drittel der gesamten Plasmid-DNS ein. Ein konjugatives Plasmid kann außerdem die für den eigentlichen Transfer nötigen Gene (Tra-Gene) selbst tragen und ist damit unabhängig zum Austausch von Genmaterial fähig (Novick et al., 1976; Bennet, 1985).

2.1.3. Mobilisation

Mit Hilfe eines "mobilizing" Plasmides können nichtkonjugative Plasmide aus (gramnegativen) E.coli-Feldstämmen z.B. in E.coli-K12-Stämme übertragen werden (Datta und Nugent, 1984). Die Gene oder Plasmide, die transferiert werden sollen, werden in ein "mobilizing" Plasmid integriert und als kombiniertes Plasmid übertragen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Transfer-Bereich eines konjugativen Plasmids in ein nichtkonjugatives Plasmid einzugliedern. Dieser Mobilisations-Bereich ermöglicht den Transfer des nichtkonjugativen Plasmids (Rieß und Pühler, 1984).

2.1.4. Transposone

Gene für bestimmte Eigenschaften wie z.B. Resistenzen oder Enterotoxinbildung, können stabil auf einem Plasmid veran-

kert sein und nur mit diesem übertragen werden oder auf einzelnen übertragbaren Elementen, wie den Transposonen oder Insertions-Sequenzen liegen. Diese umfassen ca. 700-1500 Basenpaare und können beliebig in Plasmide ein- und ausgebaut und zwischen verschiedenen Zellen ausgetauscht werden. Transposone eignen sich gut für Marker-Versuche zur Identifizierung von Plasmiden, die sonst keine eigenen Marker-Eigenschaften besitzen (Bennett, 1985).

2.2. Virulenzplasmide bei darmpathogenen E.coli-Keimen

2.2.1. Grundlagen

Aufgrund der verschiedenen Virulenzfaktoren lassen sich die darmpathogenen E. coli-Keime in fünf Gruppen einteilen:

ETEC : enterotoxische E.coli-Keime bilden Enterotoxine und Anheftungsfaktoren sog. Fimbrien (Echeverria et al., 1986; Franklin et al., 1981; Gaastera und de Graaf, 1982).

EIEC : enteroinvasive E.coli-Stämme sind Keime, die in die Epithelzellen der Darmwand eindringen und durch Proliferation zu deren Lysis führen (Harris et al., 1982; Wood et al., 1986).

EPEC : enteropathogene E.coli-Keime produzieren weder Enterotoxine noch sind sie invasiv (Levine et al., 1978). Sie heften sich entweder in gruppenweiser (Klasse I) oder diffuser Verteilung (Klasse II) an der Darmwand an und zerstören den Microvillisaum und die Mucosazellen. Die Epithelzellen verlieren das

Cytoplasma und degenerieren (Rothbaum et al., 1982; Baldini et al., 1983; Moon et al., 1983).

EHEC : enterohämorrhagische E.coli-Stämme produzieren ein Cytotoxin ähnlich dem Verotoxin.

EAEC (AEEC) : enteroadhereente E. coli-Keime (attaching and effacing E.coli-Keime) haben keinen "EPEC adherent factor", produzieren weder Enterotoxine noch andere Cytotoxine und dringen nicht in die Zellwand ein. Trotzdem verursachen sie Durchfälle (Levine M., 1987).

2.3. Adhäsionsplasmide

Anheftungsfaktoren werden sowohl von ETEC als auch von EPEC ausgebildet. Diese Anheftungsfaktoren unterscheiden sich von den Typ I-Fimbrien, die von E.coli-Stämmen der physiologischen Darmflora ausgebildet werden (Levine et al., 1980; Cravioto et al., 1982).

Die Anheftungsfaktoren der ETEC sind im Einzelnen:

Mensch:	pCF 0 159, E 8775, CFA/I, CFA/II
Schwein:	K88, 987 P, K99, F41
Rind:	K99, F41

(Gaastra u. de Graaf, 1982)

Die Gene für die Ausbildung von CFA/I Fimbrien liegen auf einem Plasmid von 60 MDa Größe (McConnell et al., 1980). Dieses trägt gleichzeitig die Gene für das ST-Toxin (Evans et al., 1975). Willshaw et al. (1982) geben dagegen die Größe des CFA/I- Plasmids mit 89 kbp* (= 60,54 MDa) an. Nach Smith et al. (1982) codieren zwei Bereiche, die durch 37 kbp (= 25 MDa) getrennt sind, für die Produktion von CFA/I. Die Gene für die ST-Toxinbildung liegen sehr nah an einem dieser Bereiche (Willshaw et al., 1982). Echeverria

*kbp: Kilobasenpaare = 10³ Nukleotidpaare der DNS-Sequenz

et al. (1986) geben die Größe des oben beschriebenen Plasmids mit 34-68 MDa an, das zusätzlich nur St-A2 codiert.

Die Gene, die für die drei Oberflächenantigene CS1, CS2, und CS3 von CFA/II codieren, liegen auf einem 60 MDa Plasmid, das meist auch für die Enterotoxinbildung zuständig ist (Cravioto et al., 1982; Mullany et al., 1983). Von den drei Oberflächenantigenen werden meist nur zwei auf der Zelloberfläche ausgebildet, entweder CS1 und CS3, CS2 und CS3 oder nur CS3. Ob CS1 oder CS2 als Oberflächenantigen auftritt, hängt von der genetischen Anlage und dem Serotyp des Wirtsstammes ab. CS3 ist immer auf der Zelloberfläche vorhanden. Wird ein CFA/II Plasmid auf einen K 12-E.coli-Stamm übertragen, bildet dieser nur CS3 aus (Cravioto et al., 1982; Mullany et al., 1983).

Humane ETEC-Stämme können weiter die Fimbrien E 8775 mit den drei Oberflächenantigenen CS4, CS5 und CS6 ausbilden (Thomas et al., 1982). M. Levine (1987) beschreibt einen ST und LT-Toxin bildenden ETEC-Stamm O 159:H 4, dessen Gene für Toxin- und Fimbrienbildung auf einem 27 MDa-Plasmid (pCF O 159) liegen.

Die Anheftungsfaktoren der beim Tier vorkommenden ETEC, wie K88 und K99, sind ebenfalls plasmidgesteuert (Mooi und de Graaf, 1985). Nach Smith et al. (1972) ist ein konjugatives Plasmid mit ca. 75 kbp (= 51 MDa) für die Bildung der K99 Fimbrien verantwortlich. Die Gene für die K88 Fimbrien liegen auf einem Plasmid mit 45 MDa, das gleichzeitig für den Raffinoseabbau verantwortlich sein kann. Die Gene sind auf der Plasmid DNS durch 30 kbp (= 20 MDa) getrennt.

Meist bewirkt ein zweites Plasmid die Toxinbildung bei porcinen ETEC-Stämmen (Franklin et al., 1981). Nach Bak et al. (1972) benötigt K88 zur Ausbildung zwei Plasmide. Eines (50 MDa) trägt die Gene für die Ausbildung der Toxine und eines (90 MDa) codiert für den Transfer. Diese zwei Plasmide können dissoziiert oder gekoppelt auftreten, so daß beide nicht gleichzeitig in einer Zelle vorliegen müssen. Nach Gaastra und de Graaf (1982) geht die Ausbildung der Fimbrien F41 und 987 P vermutlich von der chromosomalen DNS aus. Untersuchungen von de Graaf und Roorda (1982) zeigen, daß die Ausbildung von F41 nicht durch das K99-Plasmid gesteuert wird. Nach So et al. (1976) ist im ETEC-Stamm B41 ein 65 MDa Plasmid sowohl für die ST-Toxinproduktion als auch die Ausbildung des Antigens F41 verantwortlich.

Die Gene der Anheftungsfaktoren enteropathogener E.coli (EPEC) liegen ebenfalls auf Plasmiden. Der Virulenzfaktor der Klasse I ist der EAF-Faktor (EPEC adherence factor). Seine genetische Information befindet sich auf einem Plasmid mit 50-70 MDa Größe (Baldini et al., 1983; Levine et al., 1985). Nataro et al. (1985) identifizierten einen EPEC-Stamm, dessen EAF-Faktor chromosomal gesteuert wird, bei den übrigen wurde dagegen ein 55-70 MDa großes Plasmid isoliert. Scaletsky et al. (1984) und Nataro et al. (1985) trennten in vitro die lokale Anheftung an Hep-2 und Hela-Zellen von der diffusen Anheftung und stellten fest, daß nur die lokale Anheftung durch ein 60 MDa Plasmid ausgebildet wird.

Die Klasse II der EPEC-Stämme hat keinen EAF-Faktor (Levine et al., 1985; Nataro et al., 1985). Die Anlagen für die Adhäsine, die eine diffuse Anheftung (DA) an das Dünndarm-epithel ermöglichen, befinden sich entweder auf dem Chromosom oder auf einem 65 MDa Plasmid (Nataro et al., 1985). Die Existenz eines 50-70 MDa Plasmids in fast allen EPEC-Stämmen unterstützt die Annahme, daß die Gene für die EPEC-

Anheftung auf einem Plasmid liegen, da in 60% der nicht-pathogenen E.coli-Darmflora ein vergleichbares Plasmid fehlt (Baldini et al., 1983). Einen Überblick über die Virulenzfaktoren von EPEC gibt Tabelle 1.

Die Anlagerungsmöglichkeiten und genetischen Grundlagen von enteroadherenten E.coli (EAEC) bzw. "attaching and effacing" E.coli (AEEC) sind noch nicht ganz geklärt. Mathewson et al. (1986) identifizierten EAEC bzw. AEEC nur anhand der Anlagerung an Hep 2-Zellen, die sich deutlich von der EPEC unterscheidet.

2.4. Enterotoxinplasmide

2.4.1. ETEC

Nach Burgess et al. (1978) existieren zwei Varianten des hitzestabilen Toxins (ST). Das methanollösliche STa (ST I) kann im Darmligatur-Test mit 1-3 Tage alten Schweinen und im Baby-Maus-Test nachgewiesen werden. STb (ST II) ist methanolunlöslich und verursacht nur im Ligatur-Test mit Absatzferkeln eine Flüssigkeitsansammlung. ETEC (STa) bei enteritis-kranken Hunden werden erst seit 1980 nachgewiesen (Josse et al., 1980; Olson et al., 1985; Richter und Hellmann, 1985; Baljer et al., 1986).

Die Information zur Bildung von ST und LT durch ETEC kann sowohl auf einem gemeinsamen Ent-Plasmid, dessen Größe einheitlich zwischen 50 und 60 MDa liegt, als auch getrennt auf zwei Plasmiden liegen (Gyles et al., 1974; Evans et al., 1975; So et al., 1978; Santos et al., 1975). Diese Plasmide sind entweder selbst transmissibel, oder die Gene für die Toxinbildung liegen auf beweglichen Elementen wie Insertions-Sequenzen oder Transposonen. Aufgrunddessen sind die verschiedensten Kombinationen zwischen Toxinbildung und anderen Virulenzfaktoren, wie Anheftungsfaktoren oder Antibiotikaresistenzen, möglich (Maddox und Wilson, 1986). Zu den komplex gebauten Ent-Plasmiden gehören P 307 und

pCG 86 mit jeweils 54 MDa Größe, die aus porcinen ETEC-Stämmen isoliert worden sind. Sie sind nichtkonjugativ, tragen Gene für ST- und LT-Toxin und zusätzlich noch Informationen für Resistenzen (Gyles et al., 1977; Picken et al. 1983).

Echeverria und Murphy (1980) isolierten erstmals einen humanen ETEC-Stamm, der enterotoxisch und antibiotikaresistent war und ein nichtkonjugatives 54 MDa großes Plasmid enthielt. 1983 beschrieben Silva et al. ein weiteres Ent-R-Plasmid mit der Bezeichnung pMS432 von ebenfalls 54 MDa Größe.

Beim Vergleich der Ent-R-Plasmide P 307 und pCG 86, aus durchfallkranken Ferkeln, können Übereinstimmungen im ST II codierenden Bereich aufgezeigt werden. In der Grafik 1 auf Seite 13 wird dieser Bereich kompletter Homologie dargestellt. Die Abstände zwischen den Genen sind in Kilobasen angegeben. Sie beginnen mit Null bei den Genen sul-aadA und setzen sich im Uhrzeigersinn fort. Die Proteinsequenz der DNA hat eine Länge von 71 Aminosäuren. Der Produktionsbereich umfaßt 48 Aminosäuren, während die übrigen 23 am Ende eine signalpeptidähnliche Sequenz bilden. In der Zelle wird ein Prätoxin synthetisiert und dann ausgeschleust. ST I (STa) ähnelt dem oben beschriebenen ST II (ST b) zwar in Größe und Quartär-Struktur, die Aminosäure-Sequenz ist jedoch verschieden (Picken et al., 1983; Lee et al., 1983). Die Existenz von zwei verschiedenen ST I (STa)-Toxinarten (ST Ia und ST Ib) wird von Moseley et al. (1983) beschrieben, die zwei verschiedene Gensequenzen für das ST-Toxin auf Plasmiden identifizieren konnten. Dabei wurde angenommen, daß ST Ib-Gene auf humane ETEC-Stämme beschränkt sind. Plasmide, die für ST-Toxin-Bildung verantwortlich sind, haben sehr unterschiedliche Größen zwischen 21 MDa und 40-80 MDa (Gyles et al., 1974). Häufig befinden sich die Gene für ST auf dem Transfer-Bereich des Plasmids oder auf einem

Transposon (So et al., 1978; Franklin et al., 1981; Ben-nett, 1985).

Plasmide, die nur Gene für LT tragen, sind ebenfalls unterschiedlich groß. Die LT-Plasmide des E.coli-Stammes O 78:H 11 variieren in ihren Größen je nach Herkunftsort. Die in Afrika isolierten E.coli-Stämme tragen 42-43 MDa große Plasmide, die in Asien isolierten Stämme mit den O 78: H12 Antigenen haben Plasmide zwischen 51 und 60 MDa (McConnell et al., 1980). So et al. (1978) identifizierten ein 60 MDa großes Plasmid, das die Gene für LT-Toxinbildung enthält. Dallas et al. (1979) grenzten auf diesem Plasmid den Genbereich für LT-Toxinbildung auf ein DNA-Stück von 1,2 MDa ein. Inwieweit auch bei LT verschiedene Toxin-Gruppen existieren, ist noch nicht geklärt.

Green et al. (1983) isolierten ein Enterotoxin aus E.coli, das dem LT-Toxin von ETEC ähnlich ist, sich aber nicht mit LT-Antikörpern neutralisieren läßt. Es ist hitzelabil und bewirkt die Abrundung von Y-adrenal cells. Die Gene liegen jedoch nicht auf einem Plasmid sondern auf dem Chromosom. Bei Hunden fanden Olson et al. (1984 und 1985) ebenfalls ein hitzelabiles Toxin, das sich nicht mit humanen Antisera neutralisieren läßt. Auch hier konnte keine Beziehung zu einem Plasmid hergestellt werden.

2.4.2. EPEC

Humane enteropathogene E.coli verursachen typischen Läsionen in der Darmschleimhaut. Daneben können bei EPEC häufig hohe Konzentrationen eines shiga-ähnlichen Toxins (Shigella-dysenteria Typ I) nachgewiesen werden. (Klipstein et al., 1978; O'Brien et al., 1982). Diesen EPEC-Stämmen fehlt sehr oft das EAF-Plasmid (Baldini et al., 1983; Moore et al., 1983). Eine Beziehung zwischen Virulenz und eventu-

ell vorhandenen Plasmiden kann bei EPEC bis jetzt nicht aufgezeigt werden. (O'Brien et al., 1982).

2.4.3. EHEC

Viele EHEC-Stämme produzieren ein Cytotoxin, (Shiga-like toxin 2 oder Verotoxin 2) das nicht von den üblichen Antikörpern neutralisiert werden kann. Einer dieser Stämme O 157:H 7 trägt ein 60 MDa Plasmid, das für diesen Virulenzfaktor wichtig zu sein scheint (O'Brien et al., 1983a). Ein weiterer EHEC-Stamm O 26:H 11 produziert ebenfalls Verotoxin und trägt ein 60 MDa Plasmid (O'Brien et al., 1983b).

2.5. Hämolyisinplasmide

Hämolyisierende E.coli-Stämme wurden bereits 1962 von Manson aus enteritiskranken Hunden isoliert und mit der Durchfallkrankheit in Verbindung gebracht.

Die Gene für die Hämolyse befinden sich bei E.coli-Stämmen, die außerhalb des Darms isoliert wurden, z.B. bei Entzündungen des Urogenitaltraktes, auf den Chromosom (de la Cruz et al., 1983; Müller et al., 1983; Welch et al., 1983). Die Information für die Hämolyisinbildung von aus dem Darm isolierten E.coli-Stämmen liegt dagegen auf Plasmiden (Goebel et al., 1974). Die dafür verantwortlichen Gene können auf drei Plasmide verteilt sein.

Ein 41 MDa Plasmid exprimiert die Funktion für den Transport des Hämolyisins aus der Zelle, wobei ein Bereich von 3,5 MDa dieses Plasmids für die Hämolysefunktion verantwortlich ist. Das Plasmid mit 32 MDa trägt die genetische Information für den Transportvorgang, während das Dritte mit 65 MDa auf regulatorischer Ebene notwendig ist (Goebel et al., 1974; Noegel et al., 1981). Ein einzelnes Plasmid, das zur Ausbildung von Hämolyse ausreicht, wird von Goebel und Hedgpeth (1982) beschrieben. Es ist aus drei Cistrons aufgebaut. Hly A trägt die Information für einen Hämolyisin-

vorläufer, der in großen Mengen schädlich für die Zelle ist, Hly B ist für den Transport und Hly C für die Vervollständigung des Hämolytins nach dem Ausschleusen aus der Zelle verantwortlich.

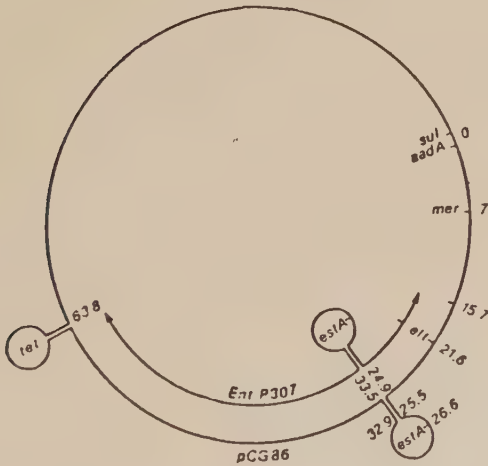
2.6. Invasionsplasmide

Bis jetzt konnten EIEC-Stämme noch nicht aus Tieren isoliert werden (Baljer, 1985). Sie werden jedoch erwähnt, weil auch hier eine Verbindung zwischen Pathogenitätsmechanismus und Plasmiden vermutet wird. Enteroinvasive E.coli tragen, wie die invasiven Stämme von Shigella, ein Plasmid von 120 bis 140 MDa Größe, das die nötigen Gene für diesen Virulenzfaktor enthält (Harris et al., 1982). Nach Untersuchungen von Wood et al. (1986) enthielten alle Sereny-Test positiven, also invasiven, E.coli-Stämme ein 120 MDa Plasmid. Ein im Sereny-Test negativer E.coli-Stamm reagierte jedoch bei der Hybridisierung positiv und läßt vermuten, daß E.coli-Stämme mit einem 120 MDa Plasmid, auch wenn sie im Sereny-Test negativ sind, invasiv sein können (Wood et al., 1986).

Einen Gesamtüberblick über die hier beschriebenen Virulenzfaktoren und deren Plasmide gibt die Tabelle 2.

Grafik 1

Schematische Darstellung homologer Bereiche der Plasmide p CG 86 und P 307
(modifiziert nach Picken et al. 1983)



Nomenklatur: elt, estA : Gene für LT und ST-Toxin
aadA: Gene für die Aminoglycosid-3 -Adenyltransferase
sul : Gene für die Sulfonamidresistenz
tet : " Tetrazyklinresistenz
die Gene für estA und tet können Schleifen bilden.

Die Zahlen geben die Größen der einzelnen Bereiche in Kilobasen (Kb) an,
 $1,47 \times 10^3$ Basenpaare = 1 Kb

Tabelle 1:

Virulenzfaktoren enteropathogener Escherichia coli-Stämme (EPEC)
modifiziert nach Scaletsky et al. (1984)

EPEC	Anheftungsfaktor/ Adhäsine	genetische Codierung	Größe (MDa)	Zell-Affinität	Serologie (O-Gruppen)
Klasse I	EAF (DA)	Plasmid	50-70	Hep-2 Zellen Hela-Zellen	111, 119, 55, 127, 128, 142
"	"	Chromosom		"	125, 128ab, 142, 55, 86, 111ab, 119
"	EAF (LA)	Plasmid	55-70	"	"
Klasse II	Adhäsine	"	65	-	44, 86, 114
"	"	Chromosom		-	"

(Scaletsky et al., 1984; Baldini et al., 1983; Nataro et al., 1985; Levine et al., 1985)

EAF: EPEC adherence factor

DA : diffuse Anheftung von EPEC an Zellen

LA : lokale Anheftung von EPEC an Zelle

MDA: Dalton x 10⁶, d (Dalton) Äquivalent zum Wasserstoffatom in Gramm

Tabelle 2:

Überblick über die in der Literatur beschriebenen Plasmide bei darmpathogenen E.coli-Stämmen

Herkunft d. E.coli-Stämme	Virulenzfaktoren*	Kategorie*	genet. Kodierung*	Größe (MDa)*	Literatur
Mensch	Anheftungsfaktoren und Toxine CFA/I u. ST	EPEC	Plasmid	58 60	Smith et al., 1979 McConnell et al., 1980; Evans et al., 1975; Willshaw et al., 1982
"	CFA/I u. ST A ₂	"	"	34-68	Echeverria et al., 1986a
"	CFA/II u. ST, LT	"	"	60	Cravioto et al., 1982; Mullany et al., 1983
"	PCF 0159 ST, LT	"	"	27	Levine, 1987
Rind/Schwein	K 99	"	"	51	Smith et al., 1972
Schwein	K 88	"	"	45	"
"	K 88 u. ST, LT	"	2 Plasmide	50 (Toxine)	Franklin et al., 1981; Bak et al., 1972
"	987 P	"	Chromosom	90 (Transport)	Gaastera und de Graaf, 1982
Rind/Schwein	F 41	"	"	65	So et al., 1976
"	F 41 u. ST	"	Plasmid	50-70	Baldini et al., 1983;
Spezies-unabhängig	EAF	EPEC	Plasmid		Levine et al., 1985
"	EAF (DA)	Klasse I	Chromosom		Nataro et al., 1985
"	EAF (LA)	"	Plasmid	60	Nataro et al., 1985; Scaletsky et al., 1984
"	Adhäsiine	Klasse II	Chromosom	65	Nataro et al., 1985
"	"	"	Plasmid		"

*Erläuterungen der Abkürzungen siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 2:

Hund	<u>Toxine</u>	ETEC	2 Plasmide	77, 46, 5	Richter u. Hellmann, 1984
Schwein	ST	"	pCG86, p307	54	Gyles et al., 1977; Picken et al., 1983
Mensch	ST, LT	"	pMS432	54	Echeverria u. Murphy, 1980; Silva et al., 1983
Mensch/Tier	"	"	"	21, 40-80	Gyles et al., 1974
"	ST Ia	(H 10407)	Plasmid	42	Moseley et al., 1983
"	ST Ib	"	"	62	"
Msch. (Afrika)	LT(078:H11)	"	42, 43	51-60	McConnell et al., 1980
Msch. (Asien)	"	(078:H11)	"	56-60	"
Msch.	Toxin (ähnlich Verotoxin 1)	(078:H12)	Chromosom	60	Green et al., 1983
Mensch	Toxin (ähnlich Verotoxin 2)	EHEC	Plasmid	60	Olson et al., 1984; 1985
"	"	(026:H11)	"	60	O'Brien et al., 1983a
"	"	"	"	60	O'Brien et al., 1983b
spezies-unabhängig	<u>Hämolyse</u>		2 Plasmide	41, 32	Goebel et al., 1974; Moegel et al., 1981
"	Transport a.d. Zelle		Plasmid	65	"
"	Koordination		pHly 152	45	Goebel u. Hedgpeth, 1982
Mensch	Hämolyse	EPEC	Chromosom	100	Beutin et al., 1985
"	schmale Hly-Zone	(0114, 0126)	Plasmid		"
"	breite Hly-Zone	(026)			"
Mensch	<u>Invasivität</u>	EPEC	Plasmid	120-140	Harris et al., 1982; Wood et al., 1986

ST, LT: hitzestabiles, hitzelabiles Enterotoxin
 CFA/I, II: Colonization factor I, II
 pCF, pCG, P, pMS, pHly: Plasmidbezeichnungen
 EAF: EPEC adherent factor
 DA, LA: diffuse, lokale Anheftung

EPEC: enteropathogene E.coli
 ETEC: enterotoxische E.coli
 EHEC: enterohämorrhagische E.coli
 EIEC: enteroinvasive E.coli
 MDa: $1,46 \times 10^3$ Basenpaare einer DNS

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Herkunft der E. coli-Stämme

Aus den Kotproben von 42 durchfallkranken Hunden, die an rezidivierenden oder chronischen Durchfällen litten, wurden 168 E. coli-Stämme isoliert. Die Gruppe der gesunden Hunde umfaßte 38 Tiere, aus deren Kotproben 118 E.coli-Stämme isoliert wurden.

Die 328 humanen E.coli-Stämme stammten aus Stuhlproben von 74 Personen aus 38 Familien, die jeweils engen Kontakt mit einem erkrankten Hund hatten. Bis auf einen Fall, bei dem ein Kind an Durchfall erkrankt und der Hund gesund war, hatten die Besitzer keine Beschwerden. In 11 der 38 Familien lebten Kinder im Alter bis zu 12 Jahren. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Eigenschaften der von Hunden und Besitzern isolierten E.coli-Stämme.

3.1.2. Anzüchtung und Isolierung der E.coli-Stämme

Die Kotprobe wurde mit einer Öse direkt und unverdünnt (1:1) auf den Plattensatz, bestehend aus einer Blut-(7% Hammelblut), Gassner- (Fa. Oxoid) und Normalagarplatte (Oxoid), mit zwei Verdünnungsstrichen verteilt. Nach Bebrütung über Nacht bei 37 °C, wurden die unterschiedlichen Keimarten bestimmt. Jeweils 5 einzelne E.coli-Kolonien wurden ausgewählt und auf Schrägagar (Blood-Agar o. Blut, Oxoid) überimpft. Dabei wurden Kolonien mit speziellen Eigenschaften, wie Hämolyse oder mucoidem Wachstum, bevorzugt. Aus Kotproben von unterschiedlichen Phasen der Erkrankung wurden jedesmal 5 Kolonien isoliert. Die Beurteilung der Hämolyse erfolgte auf der Blutplatte. Nach Bebrütung des Schrägagars über Nacht bei 37 °C, wurden die Stämme mit 1 ml Standard I-Nährbouillon (Merck) versehen und bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß aufbewahrt.

3.1.3. Plasmiddarstellung (modifiziert nach Birnboim und Doly 1979)

Der E.coli-Stamm wurde in 2,5 ml L-Broth- über Nacht bei 37 °C bebrütet. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (E.-Tube, 1,5 ml) pipettiert und 1 min bei 10000 Umdrehungen pro Minute (Upm) abzentrifugiert, der Überstand dann verworfen. Nach Zugabe von 100 µl Lysozym-resuspendiert man das Pellet und stellt die Suspension für 30 min auf Eis.

Als nächstes wurden 200 µl 1% SDS-Lösung- hinzugegeben. Nach mehrmaligem Kippen bleibt das E.-Tube für 60 min auf Eis, danach zentrifugiert man bei 15000 Upm für 10 min. Alle weiteren Arbeiten wurden mit Handschuhen ausgeführt. Ca. 0,35 ml des klaren Überstandes pipettiert man mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein silikonisiertes E.-Tube (Silikon, Serva) und gibt 1,0 ml Ethanol (-20 °C, Merck) dazu. Nach mehrmaligem Kippen wird das Tube für 30 min bei -70 °C aufbewahrt.

Nach 8 min Zentrifugieren bei +4 °C mit 10000 Upm und zügigem Abkippen des klaren Überstandes, gibt man zu dem verbleibenden Pellet 100 µl 0,1 M Na-acetat-Lsg.- und weitere 200 µl Ethanol (-20 °C) hinzu. Nach 15 min bei -70 °C wurde erneut für 8 min bei +4 °C mit 10000 Upm zentrifugiert.

Nach dem Abkippen des Überstandes wird das E.-Tube sorgfältig ausgetrocknet, wobei das Pellet im Tube verbleiben sollte. Anschließend entfernt man den restlichen Alkohol durch Vakuumtrocknen.

Das trockene Pellet wurde in 18 µl E-Puffer- mit 2 µl Ribonuklease- (Boehringer) resuspendiert und 10 min bei 37 °C bebrütet. Zuletzt wurden als Farbindikator 2 µl BSE-Puffer- hinzugefügt.

-Die Zusammensetzung der mit ~ bezeichneten Substanzen ist in der Übersicht im Anhang aufgelistet.

3.1.4. Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte mit 4 Volt/cm (200 mA) bei Zimmertemperatur, wobei auch der Elektrophorese-Puffer (E.-Puffer)+ und das Agarosegel (Seakem) zimmerwarm waren. Nach fünf Stunden wurde das Gel für 15 min in ein Färbebad mit Ethidiumbromid (Weißherbst-Färbung+) gelegt und anschließend 20 min in Aqua dest. entfärbt. Mit Hilfe der UV-Durchleuchtung (Wellenlänge 302 nm) wurde die Plasmid-DNS im Gel sichtbar gemacht und mit einem Polaroid-Film (Nr. 665 m. Negativ, Nr. 667 o. Negativ) durch einen Rotfilter fotografiert.

3.1.5. Bestimmung der Plasmidgrößen

Zur Größenmessung der Plasmide lag am Rand eines jeden Gels, mit dem Nullpunkt in Höhe der Slots, ein Lineal. Die Laufstrecken verschiedener Marker-Plasmide mit definierten Molekulargewichten wurden daran abgelesen. Das Molekulargewicht von Plasmiden aus den gesammelten E. coli-Feldstämmen konnte dann entweder im direkten Vergleich mit einem Markerplasmid ermittelt, oder aufgrund der mit dem Lineal gemessenen Laufstrecke geschätzt werden.

Die Molekulargewichte der Markerplasmide und deren Laufstrecken sind in der Legende zur Grafik 2 aufgelistet. Anhand dieser Werte wurde eine Eichkurve erstellt, auf der die Molekulargewichte der verschiedenen Plasmide abgelesen werden können (vgl. Grafik 2 und Abbildung 1 im Bildteil). Die Laufstrecke der Reste der chromosomalen DNS betrug etwa 1/3 der Strecke der Lauf-Front, die auf dem Gel als blaue Linie zu sehen ist. Plasmide aus E.coli-Feldstämmen mit kürzeren Laufstrecken wurden als groß (1,2 od.3/) bezeichnet. Ihr Molekulargewicht lag über 50 MDa. Sie gehörten damit zum Größenbereich A. Plasmide, die weiter als die chromosomalen DNS gelaufen sind, wurden als klein (/1 bis >5) bezeichnet. Ihre Laufstrecken wurden in zwei Größenbereiche geteilt: Bereich B enthielt Plasmide mit einer Laufstrecke

bis 6 cm und einem Molekulargewicht zwischen 50 und 20 MDa. Plasmide, die weiter als 6 cm liefen, gehörten zum Bereich C mit einem Molekulargewicht unter 20 MDa.

3.1.6. Toxinnachweis

3.1.6.1. Baby-Maus-Test (nach Dean et al., 1972)

Zwei bis drei Tage alte Baby-Mäuse bekamen 0,1 ml einer, über Nacht bei 37 °C geschüttelten, E.coli-Bouillon-Kultur (Tryptic Soy Bouillon, Difco) mit einer Sonde direkt in den Magen verabreicht und wurden anschließend 3 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Zur Bestimmung des Verhältnisses von Darmgewicht zu Körpergewicht wurden die Baby-Mäuse dann mit Äther (Hoechst) getötet. Im positiven Fall war das Verhältnis Darmgewicht-Körpergewicht (ohne Darm) größer als 0,090. Als positive Kontrolle diente der enterotoxinbildende E.coli-Stamm O 42 (Nr.3808) aus der hauseigenen Stammsammlung. Für diesen Test wurden 35 E.coli-Stämme durchfallkranker Hunde und 38 E.coli-Stämme von Besitzern ausgewählt. Jeder Stamm enthielt mindestens ein großes Plasmid.

3.1.6.2. Darmligaturtest

Der Darmligaturtest wurde nach der von Balier et al. (1975) beschriebenen Technik bei 3-5 Wochen alten Ferkeln durchgeführt. Der zu testende Stamm wurde 18 Stunden bei 37 °C in Standard I-Bouillon (Merck) angezüchtet. Zur Anästhesie der Ferkel diente eine Kombinationsnarkose aus Hypnodil und Stresnil (Janssen). Die Länge der Darmsegmente im Dünndarm betrug 10 cm, wobei zwischen den beimpften Segmenten 5 cm lange, mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte, Kontrollsegmente lagen. Es wurde jeweils 1 ml Suspension pro Segment eingespritzt. Um den Empfindlichkeitsverlust zwischen dem Anfang und Ende des Dünndarms bei der Auswertung mit berücksichtigen zu können, wurde am Anfang und am Ende

des Darmes der enterotoxinbildende E.coli-Stamm O 149:K 88 aus der hauseigenen Stammsammlung als Positivkontrolle mitgetestet. 12 bis 14 Stunden post operationem beurteilte man, nachdem die Tiere mit Narcoren (IFFA Merieux) eingeschläfert worden waren, die Reaktion aufgrund der gebildeten Flüssigkeit in den entsprechenden Segmenten. Die Auswertung erfolgte nach dem von Baljer et al., (1975) beschriebenen Bewertungsschema von negativ bis 4+.

Mit diesem Test wurden alle Stämme, die für den Baby-Maus-Test ausgewählt worden waren, und von jedem der vorkommenden Plasmidmuster mindestens 2 E.coli-Stämme, auf Enterotoxinbildung untersucht. Insgesamt wurden 47 E.coli-Stämme von gesunden und 46 E.coli-Stämme von kranken Hunden sowie 54 E.coli-Stämme von Hundebesitzern überprüft.

Tabelle 3:
Biologische Eigenschaften von E.coli-Stämmen, die aus Kotproben
durchfallkranker und gesunder Hunde, sowie aus gesunden Hundebesitzern
isoliert wurden.

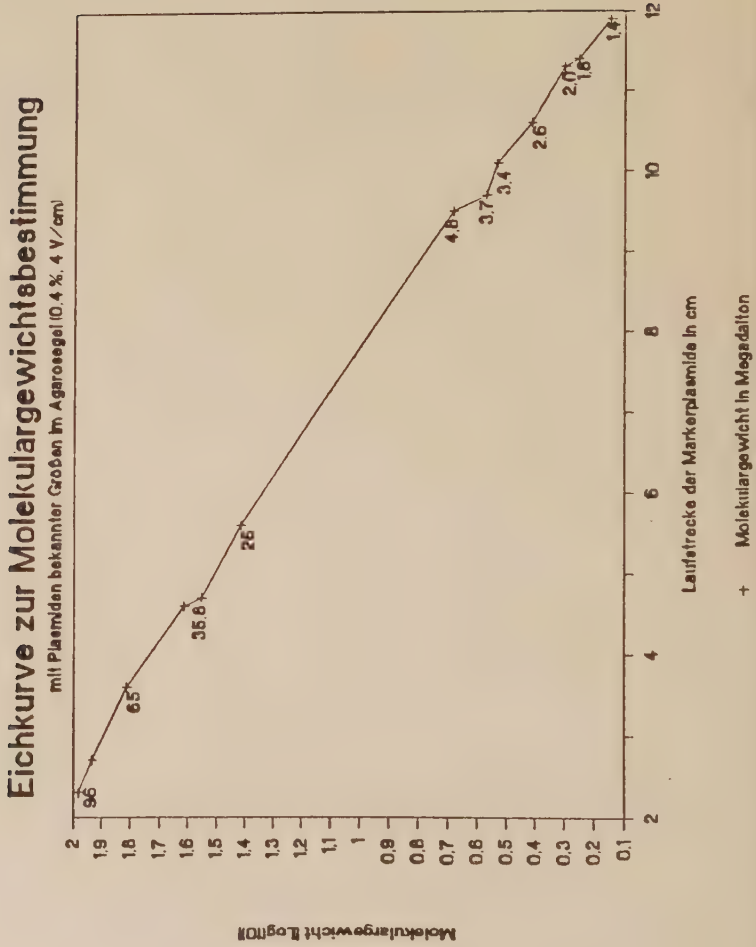
Herkunft der E.coli-Stämme	n	Zahl der Stämme mit		
		Schleim- bildung	Hämolysin- bildung	Enterotoxin- bildung
Hunde mit Diarrhoe	168	26 15,5%	67 39,9%	9 5,4%
Gesunde Hunde	118	11 9,3%	31 26,3%	- -
Hunde- besitzer	328	25 7,6%	82 25,0%	- -

Legende zur Grafik 2:

Die Molekulargewichte der Markerplasmide und deren durchschnittliche Laufstrecken auf einem 0,4% Agarosegel bei 4 V/cm für 5 Stunden.

Bezeichnung d. Markerplasmide	Größe in (MDa)	durchschnittliche Laufstrecken (cm)	Größe bereich
R 40	96	2,3	A
R 621a	65	3,6	A
RP 4	36	4,7	B
R 6K	26	5,6	B
V 517	35,8	4,8	B
V 517	4,8	zwischen 10 und 14 cm	C
"	3,7	"	C
"	3,4	"	C
"	2,6	"	C
"	2,0	"	C
"	1,8	"	C
"	1,4	"	C
pBR 322	2,6	11,8	C

Grafik 2



3.2. Ergebnisse

3.2.1. Vorkommen und Größenverteilung von Plasmiden bei caninen E.coli-Stämmen

Bei 286 E.coli-Stämmen, die aus Kotproben von Hunden stammten, wurde die Frage untersucht, ob und wenn ja, welche Plasmide bei caninen E.coli-Stämmen vorkommen. Die Ergebnisse der Plasmidanalyse mittels Gelelektrophorese sind in der Grafik 3 und Abbildung 2 (Bildteil) dargestellt. Die Trennung der Plasmide in große und kleine Plasmide erfolgte nach ihrer Lage im Gel oberhalb (Molekulargewicht über 50 MDa) oder unter unterhalb (Molekulargewicht unter 50 MDa) der chromosomalen DNS.

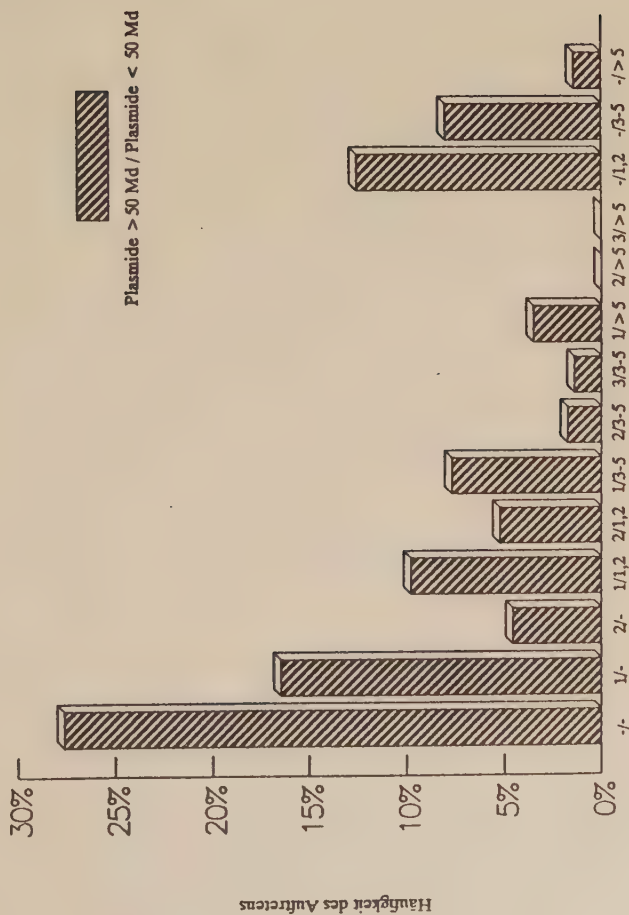
Von den 286 E.coli-Stämmen hatten 79 Stämme (27,6%) kein Plasmid. 72,4% der E.coli-Stämme wiesen ein Plasmid oder mehrere Plasmide auf, die aber in ganz unterschiedlichen Molekulargewichtsgrößen vorkamen. Die 11 verschiedenen Plasmidmuster beinhalteten Stämme mit großen oder kleinen Plasmiden und Stämme, die sowohl große als auch kleine Plasmide enthielten. Die Zahl der Einzelplasmide schwankte bei den großen Plasmiden zwischen 1 und 3. Dagegen konnten bei den kleinen Plasmiden bis zu 10 im E.coli-Stamm vorhanden sein. Insgesamt konnten bis zu 13 verschiedene Plasmidgrößen in einem Stamm gefunden werden.

Unter den 286 E.coli-Stämmen waren Stämme mit Eigenschaften, die als Virulenzfaktoren in Betracht kamen. Dabei handelte es sich um die Eigenschaften Hämolyisin- und Enterotoxinproduktion sowie die Bildung einer Schleimkapsel. Durch die Aufschlüsselung der Ergebnisse aus der Plasmidbestimmung bezogen auf die biologischen Eigenschaften der Stämme, sollte geklärt werden, welche Eigenschaften im Genom der Chromosomen und welche extrachromosomal im Plasmid verankert sein können.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, waren die Eigenschaften Hämolyisin- und Schleimbildung nicht immer mit dem Vorhanden-

sein eines Plasmids korreliert. 24 der 91 hämolysinbildenden Stämme und 12 der 37 schleimbildenden Stämme hatten kein Plasmid. Dagegen konnten in den Stämmen mit Enterotoxinbildung immer Plasmide aus den Größenbereich A (über 50 MDa; ABC, AC) nachgewiesen werden. Plasmide aus den Größenbereichen A und AC konnten auch bei relativ vielen hämolysinbildenden E.coli-Stämmen gefunden werden. Man darf aber nicht übersehen, daß es auch sehr viele nicht-hämolysin- und enterotoxinbildende Stämme mit diesen Plasmiden (Gruppe AC) gab. Insgesamt fällt auf, daß die Stämme ohne die oben erwähnten Eigenschaften in ihrem Plasmidmuster den hämolysin- und schleimbildenden Stämmen sehr ähnlich waren. Die Ergebnisse sind zur besseren Übersicht zusätzlich in Graphik 4 dargestellt.

Überblick über unterschiedliche Plasmidmuster von 286 E. coli-Stämmen aus 80 Hundekotproben

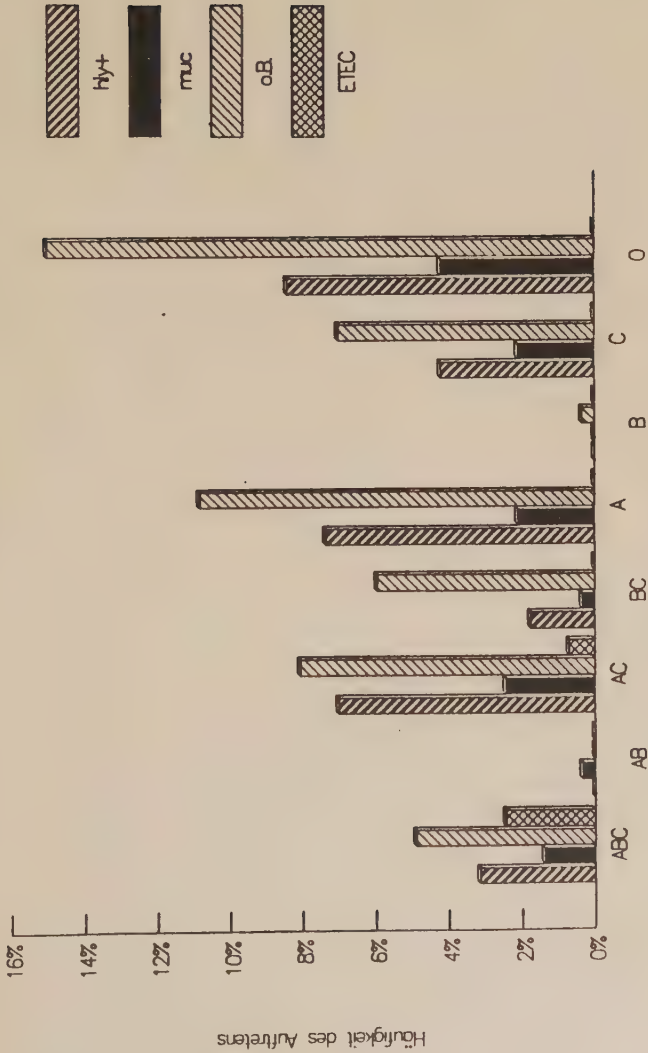


Verteilungsmuster der Plasmide in den E. coli Stämmen

Tabelle 4:
Überblick über die Plasmidverteilung innerhalb der biologisch und physiologisch unterschiedlichen E.coli-Stämme aus 80 Hunden.

Eigenschaft der E.coli-Stämme	n	Anzahl der Stämme mit Plasmiden in verschiedenen Größenbereichen							
		ABC	AB	AC	BC	A	B	C	O
mit Hämolysebildung	91	9	-	20	5	21	-	12	24
mit Enterotoxinbildung	9	7	-	2	-	-	-	-	-
mit Schleimbildung	37	4	1	7	1	6	-	6	12
ohne Besonderheiten	149	14	-	23	17	31	1	20	43

Plasmidmuster verschiedener Größen
in biologisch und physiologisch unterschiedlichen E. coli-Stämmen
aus 80 Hundekotproben



Einzelne und kombinierte Größenbereiche der Plasmide

3.2.2. Vergleich der Plasmidverteilung zwischen E.coli-Stämmen gesunder und durchfallkranker Hunde.

Für weitere epidemiologische Untersuchungen mittels Plasmidanalyse war es wichtig zu wissen, ob in der Plasmidverteilung Unterschiede zwischen E.coli-Stämmen von gesunden und durchfallkranken Hunden auftraten. Die Plasmidmuster der beiden Versuchstiergruppen sind in Tabelle 5 und in Graphik 5 dargestellt.

Die Unterschiede im Plasmidmuster der E.coli-Stämme beschränken sich auf einige wenige Plasmidmuster. E.coli-Stämme mit nur einem Plasmid findet man bei 20,3% der Stämme von gesunden und bei 13,7% der Stämme von durchfallkranken Hunden. Ein umgekehrtes Verhältnis ergab sich beim Plasmidmuster 1/3-5. 2,5% der E.coli-Stämme gesunder Hunde und 11,3% der E.coli-Stämme kranker Hunde zeigten dieses Muster. Auffallend ist auch, daß E.coli-Stämme mit mehr als 3 kleinen Plasmiden signifikant häufiger aus den Kotproben von Hunden mit Diarrhoe als von gesunden Hunden isoliert wurden und die Plasmidmuster 2/3-5, 3/3-5 und 1/<5 nur in E.coli-Stämmen kranker Hunde auftraten. Von den aus gesunden Hunden isolierten Stämmen waren 34,7% plasmidfrei, bei denen aus durchfallkranken Hunden dagegen 22,6%.

Wie aus Tabelle 6 und Grafik 6 ersichtlich, unterschieden sich die hämolysinbildenden Stämme und solche mit Schleimkapsel aus den kranken Hunden im Plasmidmuster nicht von denen aus gesunden Hunden. Dagegen wiesen 6 der enterotoxinbildenden E.coli-Stämme Plasmidmuster auf, die nur in Stämmen kranker Hunde gefunden wurden (vgl. Abbildung 3 im Bildteil).

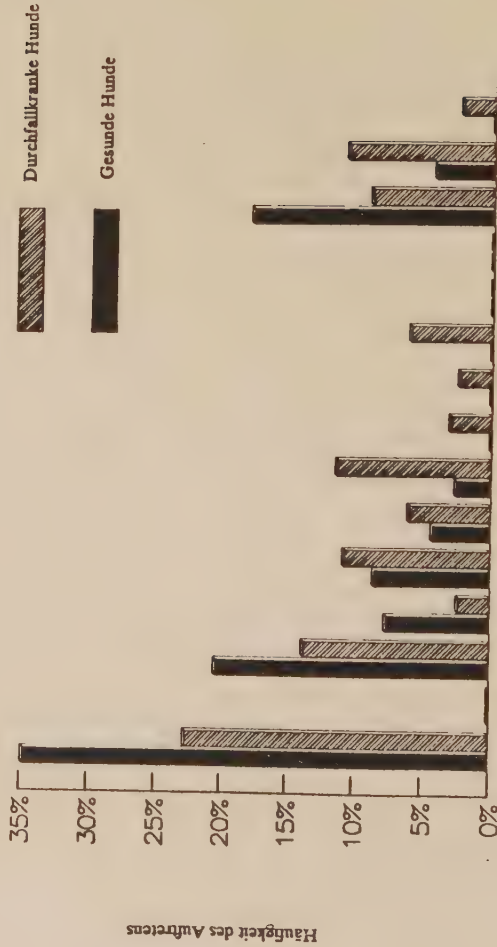
Tabelle 5:
Vergleich der unterschiedlichen Plasmidmuster und deren Verteilung in E.coli-Stämmen kranker und gesunder Hunde.

Herkunft der E.coli-Stämme	n	Plasmidfreie E.coli-Stämme	Anzahl der E.coli-Stämme mit den verschiedenen Plasmidmustern ¹⁾												
		-/-	1/-	2/-	1/1,2	2/1,2	1/3-5	2/3-5	3/3-5	1/>5	2/>5	3/>5	-/1,2	-/3-5	-/>5
Hunde mit Diarrhoe	168 100%	38 22,6%	23 13,7%	4 2,4%	18 10,7%	10 6,0%	19 11,3%	5 3,0%	4 2,4%	10 6,0%	-	-	15 8,9%	18 10,7%	4 2,4%
gesunde Hunde	118 100%	41 34,7%	24 20,3%	9 7,6%	10 8,5%	5 4,2%	3 2,5%	-	-	-	-	-	21 17,8%	5 4,2%	-

¹⁾ Plasmide > 50 MDa / Plasmide < 50 MDa

Grafik 5

Vergleich unterschiedlicher Plasmidmuster
 in 168 E.coli Stämmen durchfallkranker und 118 E. coli Stämmen gesunder Hunde



-/- 1/- 2/- 1/1,2 2/1,2 1/3-5 2/3-5 1/ > 5 2/ > 5 3/ > 5 1/1,2-3-5 1/ > 5

Verteilungsmuster der Plasmide in den E. coli Stämmen
 (Plasmide > 50 Md / Plasmide < 50 Md)

Tabelle 6:

Vergleich der Plasmidverteilung innerhalb der biologisch und physiologisch unterschiedlichen E.coli-Stämme aus kranken Hunden mit denen gesunder Hunde.

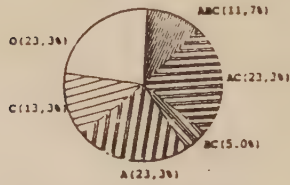
Eigenschaft der E.coli-Stämme	Herkunft der E.coli-Stämme	n	Anzahl der Stämme mit Plasmiden in den verschiedenen Größenbereichen									
			ABC	AB	AC	BC	A	B	C	O		
mit Hämolysebildung	Hunde mit Diarrhoe gesunde Hunde	60	7	-	14	3	14	-	8	14		
		31	2	-	6	2	7	-	4	10		
mit Enterotoxinbildung	Hunde mit Diarrhoe gesunde Hunde	9	7	-	2	-	-	-	-	-		
mit Schleimbildung	Hunde mit Diarrhoe gesunde Hunde	26	3	1	7	-	1	-	6	8		
		11	1	-	-	1	5	-	-	4		
ohne Besonderheiten	Hunde mit Diarrhoe gesunde Hunde	73	7	-	19	10	11	1	9	16		
		76	7	-	4	7	20	-	11	27		

Grafik 6

VERGLEICH VON PLASMIDEN UNTERSCHIEDLICHER GRÖSSE IN E.COLI-STÄMMEN KRANKER UND GESUNDER HUNDE

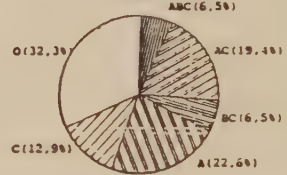
Plasmidgrößen in hämolyzierenden E.coli-Stämmen aus Hunden mit Diarrhoe

n = 67 (100%)



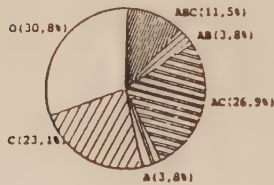
Plasmidgrößen in hämolyzierenden E.coli-Stämmen aus gesunden Hunden

n = 31 (100%)



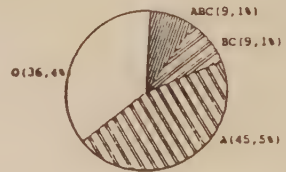
Plasmidgrößen in schleimbildenden E.coli-Stämmen aus Hunden mit Diarrhoe

n = 26 (100%)



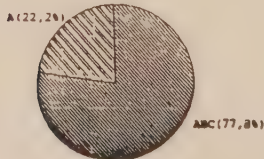
Plasmidgrößen in schleimbildenden E.coli-Stämmen aus gesunden Hunden

n = 11 (100%)



Plasmidgrößen in enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen aus Hunden mit Diarrhoe

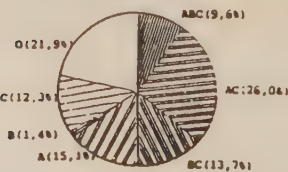
n = 9 (100%)



Aus gesunden Hunden konnten keine enterotoxinbildenden E.coli-Stämme isoliert werden

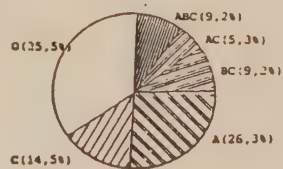
Plasmidgrößen in E.coli-Stämmen ohne Besonderheiten aus Hunden mit Diarrhoe

n = 66 (100%)



Plasmidgrößen in E.coli-Stämmen ohne Besonderheiten aus gesunden Hunden

n = 76 (100%)



Größenbereiche: A: Plasmide über 50 MDa, B: Plasmide zwischen 50 und 20 MDa, C: Plasmide unter 20 MDa, O: plasmidfreie E.coli-Stämme

Größenkombinationen: ABC, AC, AB, BC

3.2.3. Vergleich der Plasmidmuster bei E.coli-Stämmen aus Stuhl- bzw. Kotproben durchfallkranker Hunden und Hundebesitzer.

ETEC sind als Durchfallerreger bei Hund und Mensch beschrieben. Durch den engen häuslichen Kontakt zwischen Hund und Mensch könnte eine wechselseitige Übertragung der ETEC-Keime möglich sein. Um dies zu untersuchen, wurden in 38 Familien mit durchfallkranken Hunden die, aus Faezesproben der Hunde und Familienangehörigen isolierten, E.coli-Stämme auf ihren Plasmidgehalt untersucht. In Tabelle 7 und Grafik 7 sind zunächst, in einem Überblick, die Plasmidmuster der caninen E.coli-Stämme denen der humanen Stämme gegenübergestellt.

Die Plasmidmuster geben keinen Anhaltspunkt auf irgendwelche speziesspezifische Besonderheiten. Die Verteilung der Plasmidgrößen, sowie der Anteil der plasmidfreien Stämme, waren in beiden Spezies etwa gleich.

Beim Vergleich der einzelnen Plasmidmuster aus E.coli-Stämmen der Besitzer mit dem des dazugehörigen Hundes, stimmten in 4 der 38 Familien einzelne Plasmide in E.coli-Stämmen aus Hund und Besitzer in ihrer Größe überein. Dabei handelte es sich jeweils um kleine (<20 MDa) Plasmide (vgl. Abbildung 4 im Bildteil). 11 der 38 Familien hatten Kinder unter 12 Jahren. In einer dieser 11 Familien sind beim Hund und einem Kind Stämme mit völlig identischen Plasmidmustern isoliert worden. 2 E.coli-Stämme des Kindes und 3 Stämme aus dem Hund enthielten jeweils 10 Plasmide in gleicher Anordnung und zwar nach dem Muster 1/ >5 (Gruppe ABC) (vgl. Abbildung 5 im Bildteil).

Tabelle 7:

Vergleich der unterschiedlichen Plasmidmuster von E.coli-Stämmen aus Kotproben kranker Hunde und gesunder Hundebesitzer.

Herkunft der E.coli-Stämme	Plasmidfreie n	E.coli-Stämme	Anzahl der E.coli-Stämme mit den verschiedenen Plasmidmustern											
	-/-	1/-	2/-	1/1,2	2/1,2	1/3-5	2/3-5	3/3-5	1/>5	2/>5	3/>5	-/1,2	-/3-5	-/>5
Hunde mit Diarrhoe	168 100%	38 22,6%	23 13,7%	4 2,4%	18 10,7%	10 6,0%	19 11,3%	5 3,0%	4 2,4%	10 6,0%	-	-	15 8,9%	18 10,7%
Hunde-Besitzer	328 100%	68 20,7%	23 7,0%	8 2,4%	6 1,8%	19 5,8%	53 16,2%	15 4,6%	-	21 6,4%	15 4,6%	2 0,6%	40 12,2%	50 15,2%

3.2.4.

Bildteil mit Legende zu den Abbildungen

Legende zur Abbildung 1

Die Molekulargewichte der Markerplasmide und deren durchschnittliche Laufstrecken auf einem 0,4% Agarosegel bei 4 V/cm für 5 Stunden.

lfd. Nr.	Bezeichnung d. Markerplasmide	Größe in (MDa)	durchschnittliche Laufstrecken (cm)	Größe bereich
1.	R 40	96	2,3	A
2.	R 621a	65	3,6	A
3.	RP 4	36	4,7	B
4.	R 6K	26	5,6	B
5.	V 517	35,8	4,8	B
	V 517	4,8	zwischen 10 und	C
	"	3,7	14 cm	C
	"	3,4	"	C
	"	2,6	"	C
	"	2,0	"	C
	"	1,8	"	C
	"	1,4	"	C
6.	pBR 322	2,6	11,8	C

Legende zur Abbildung 2

Beispiele für die unterschiedlichen Verteilungsmuster der Plasmide, die in den untersuchten E.coli-Stämmen aufgetreten sind.

lfd. Nr.	Eigenschaft d. E.coli-Stammes	Herkunft d. E.coli-Stammes
7.	mutoid	(219) Hund
8.	hämolyzierend	(221) "
9.	anhämolyzierend	(182) "
10.	"	(289) Mensch
11.	"	(15) Hund
12.	"	(49) Mensch
13.	hämolyzierend	(2573) Hund
14.	"	(224) "
15.	anhämolyzierend	(412) Mensch
16.	"	(269) "
17.	hämolyzierend	(539) Hund
18.	anhämolyzierend	(176) "
19.	hämolyzierend	(226) "
20.	"	(46) "

Legende zur Abbildung 3

Darstellung der fünf unterschiedlichen Plasmidmuster, die bei den acht enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen kranker Hunde aufgetreten sind.

lfd. Nr.	Eigenschaft d. E.coli-Stammes	Herkunft d. E.coli-Stammes
21.	anhämolisierend (420)	Hund
22.	" (421)	"
23.	hämolisierend (3208)	"
24.	" (3808)	"
25.	" (31)	"
26.	" (200)	"
27.	" (202)	"
28.	" (2572)	"

Legende zur Abbildung 4

E.coli-Stämme mit einzelnen Plasmiden gleicher Größe aus vier Hunden und deren Besitzern.

lfd. Nr.	E.coli-Stamm/ Hund	E.coli-Stamm/ Besitzer
29.	(292,294) anhämolysierend	(286) hämolysierend
30.	(452,454) mucoid	(445,449) anhämolysierend
31.	(588a) anhämolysierend	(585a) "
32.	(176,179,184) "	(166) hämolysierend

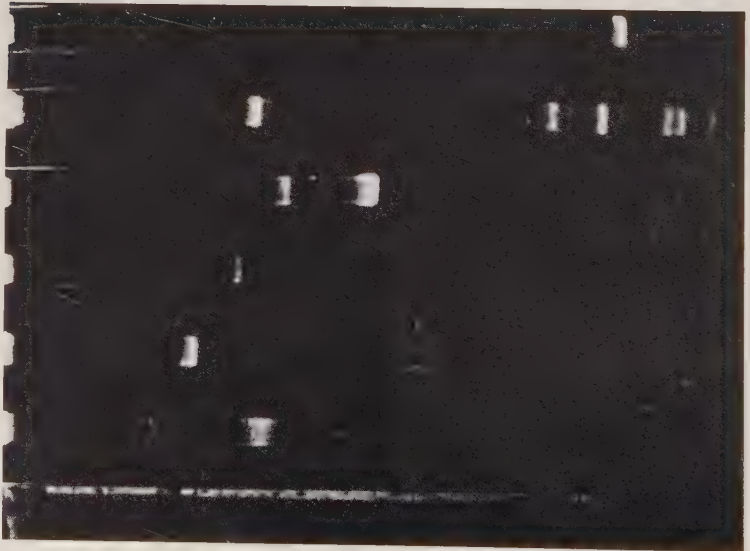
Legende zur Abbildung 5

Identische Plasmidmuster von fünf E.coli-Stämmen, von denen zwei aus der Stuhlprobe eines Kindes und drei aus dem Hund dieser Familie isoliert wurden.

lfd. Nr.	Eigenschaft d. E.coli-Stammes	Herkunft d. E.coli-Stammes
33.	hämolisierend (224)	Hund
34.	" (226)	"
35.	" (228)	"
36.	anhämolisierend (245)	Kind
37.	" (246)	"

Abbildung 1

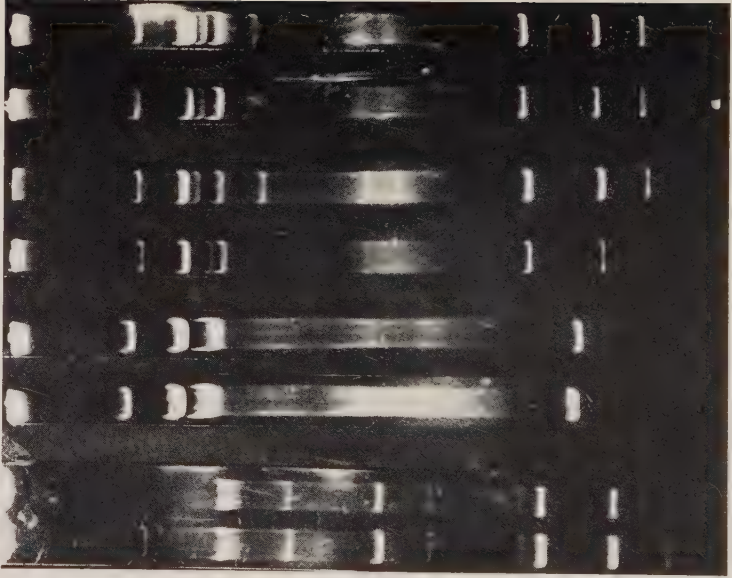
Die Molekulargewichte der Markerplasmide und deren durchschnittliche Laufstrecken auf einem 0,4% Agarosegel bei 4 V/cm für 5 Stunden.



1. 2. 3. 4. 5. 6.

Abbildung 3

Darstellung der fünf unterschiedlichen Plasmidmuster, die bei den acht enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen kranker Hunde aufgetreten sind.



21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28.

Abbildung 2

Beispiele für die unterschiedlichen Verteilungsmuster der Plasmide, die in den untersuchten *E. coli*-Stämmen aufgetreten sind.

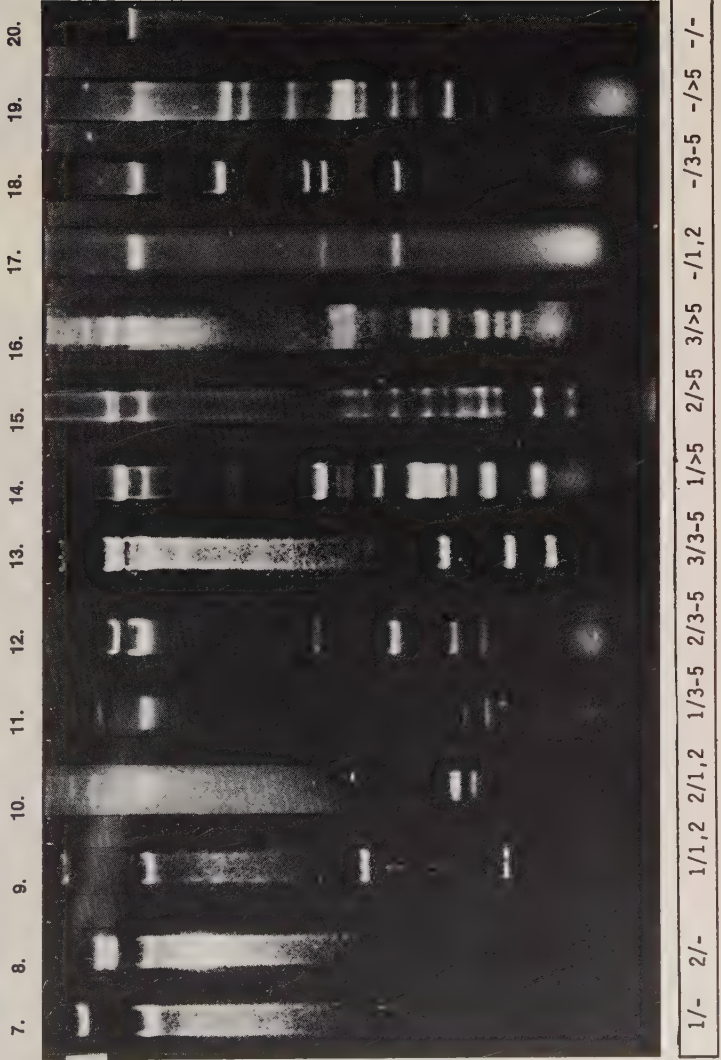


Abbildung 4

E.coli-Stämme mit einzelnen Plasmiden gleicher Größe aus vier Hunden und deren Besitzern.



29.

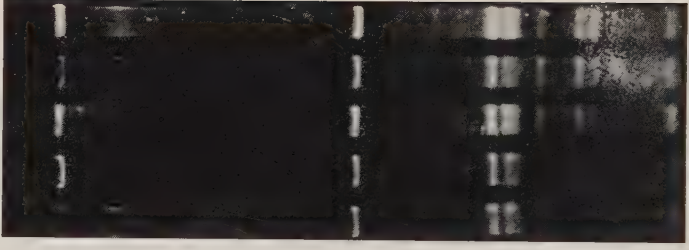
30.

31.

32.

Abbildung 5

Identische Plasmidmuster von fünf E.coli-Stämmen, von denen zwei aus der Stuhlprobe eines Kindes und drei aus dem Hund dieser Familie isoliert wurden.



33. 34. 35. 36. 37.

4. Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen hatten das Ziel, epidemiologische Zusammenhänge zwischen E.coli-Stämmen von Hunden und deren Besitzern aufzuklären und eventuelle Unterschiede zwischen E.coli-Stämmen kranker und gesunder Hunde aufzuzeigen. Bisher ging man davon aus, daß bei den pathogenen E.coli-Stämmen Wirtsspezifitäten bestehen. Dies trifft besonders für die Gruppe der enterotoxischen E.coli-Keime zu, die beim Menschen und verschiedenen Tieren Durchfallkrankheiten auslösen, aber bei jeder Spezies andere Eigenschaften aufweisen (Echeverria et al., 1986 ; Franklin et al., 1981; Willshaw et al., 1982). Die Ergebnisse unserer Plasmidanalysen bestätigen, bis auf eine Ausnahme, diese Erfahrungen. Die Plasmidmuster von Hunden sowie von deren Hundebesitzern waren ausgesprochen heterogen, auch unter den Familienmitgliedern. Nur in einer Familie konnten aus der Kotprobe eines Hundes und der des Kindes E.coli-Stämme mit identischem Plasmidmuster nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß auch bei E.coli eine Übertragung zwischen verschiedenen Spezies möglich ist, und daß sich diese E.coli-Keime auch wechselseitig im Darmbereich ansiedeln können. Da in dem von uns beschriebenen Fall nur bei dem Kind dieser Familie der E.coli-Stamm mit dem des Hundes identisch war, liegt die Vermutung nahe, daß doch ein intensiver Kontakt für die Übertragung erforderlich ist. Natürlich reicht die Probenzahl unserer Untersuchungen nicht aus, um Angaben über die Häufigkeit von identischen Plasmidmustern zu machen. In Anbetracht dessen, daß die Anzahl der untersuchten Familien mit 38 schon sehr begrenzt war und davon nur 11 Familien Kinder hatten, ist dieser eine Fall dennoch beachtenswert. Obwohl die E.coli-Stämme in ihren Plasmidmustern identisch waren, litt nur der Hund an chronischem Durchfall. Keiner der Stämme bildete Enterotoxin. Es ist mit unseren Untersuchungen auch nicht festzustellen, von wem die Übertragung ausging und ob noch wei-

tere Übereinstimmungen zwischen diesen Stämmen existieren. Vergleichbare Untersuchungen gab es bisher nicht, weil man bis jetzt bei der Epidemiologie immer auf den sehr zeitaufwendigen Nachweis des Serotyps angewiesen war. Der serologische Nachweis ist aber mit den entsprechenden Probenzahlen kaum durchführbar. Außerdem sagt der Serotyp nicht unbedingt etwas über die Identität der Stämme aus, denn es werden die gleichen Serotypen oft weltweit bei Menschen und Tieren isoliert (McConnell et al., 1980). Mit der Plasmidanalyse ist dagegen eine viel feinere Charakterisierung der Stämme möglich. Wie Untersuchungen an *S. typhimurium* mit der Plasmidanalyse zeigen, besteht bei einer Übereinstimmung der Plasmidmuster sicher eine größere Wahrscheinlichkeit der Identität zweier Stämme, als bei der Übereinstimmung der Antigene (Helmut et al., 1985). Man darf aber bei der Plasmidanalyse nicht übersehen, daß einzelne Plasmide bei in vitro Anzucht oder der Darmpassage spontan verloren gehen können. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß in den von uns untersuchten Familien auch bei Stämmen eine Übertragung stattgefunden hat, die nur einzelne übereinstimmende Plasmide enthielten. Eine solche Übereinstimmung wurde in 4 Fällen nachgewiesen. Eine Bestätigung dieser Vermutung muß neben der Genomanalyse durch epidemiologisch ergänzende Untersuchungen erfolgen. Beim Vergleich der Plasmidmuster aus *E.coli*-Stämmen kranker Hunde mit denen gesunder Hunde, konnten in der Varianz der Plasmide keine charakteristischen Muster festgestellt werden. Eine Unterscheidung pathogener Stämme nach verschiedenen Plasmiden wie bei *S. typhimurium* (Helmut et al., 1985) ist bei *E.coli* nicht eindeutig möglich.

Die vorliegenden Untersuchungen waren als erste sondierende Versuche geplant, die prinzipiell die Übertragungsmöglichkeit von *E.coli*-Stämmen zwischen Hund und Mensch prüfen sollten. In nachfolgenden Untersuchungen sind weitere Virulenzeigenschaften miteinzubeziehen, um *E.coli* als Zoono-

seerreger zu bestätigen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde von den vielen Virulenzfaktoren nur die Enterotoxinbildung (ST, Darmligatur-Test) analysiert. Enterotoxische Stämme wurden bei Hunden bereits beschrieben (Richter und Hellmann, 1984; Baljer et al., 1986; Josse et al., 1980).

Bei unseren Untersuchungen konnten nur bei 5 Hunden enterotoxinbildende E.coli-Stämme identifiziert werden. Hinsichtlich der Spezies Hund besteht schon lange der Verdacht, daß neben dem Virulenzfaktor Enterotoxinbildung andere Faktoren eine Rolle spielen bzw. andere Virulenzfaktoren als Pathogenitätsmerkmale vorkommen (Olson et al., 1984, 1985). Beim Menschen kennen wir neben ETEC noch nicht-enterotoxinbildende EPEC, und EIEC Stämme als potentielle Durchfallerreger (Nataro et al., 1985; Beutin et al., 1986; Wood et al., 1986). Eine solche Differenzierung auch bei den Hunden vorzunehmen, war nicht das Ziel dieser Arbeit und ist weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Aufgrund unserer Ergebnisse kann man aber zumindest vermuten, daß pathogene E.coli-Keime, neben anderen Durchfallerregern wie *Salmonella typh.* oder *Yersinia ent.* als Zoonoseerreger in Betracht kommen.

Bei epidemiologischen Routineuntersuchungen ist zur Bestimmung der unterschiedlichen Virulenzfaktoren von E.coli eine Genomanalyse den biologischen Nachweisverfahren (Darmligatur-, Baby-Maus-Test, Zellkultur) vorzuziehen.

In der Praxis ist bereits die DNS-Hybridisierung für die Diagnostik der die Reisedurchfälle verursachenden ETEC des Menschen etabliert.

Die DNS-Hybridisierung als Diagnostikum setzt die Entwicklung von "Proben" mit markierten genetischen Abschnitten im Plasmid, die z.B. eine Virulenzeigenschaft codieren, voraus. Unsere Untersuchungen lassen vermuten, daß sich die Gene für die enterotoxische Eigenschaft auf einem Plasmid befinden, da wir keine plasmidfreien ETEC-Stämme isolieren

konnten. Die bei diesen Stämmen nachgewiesenen Plasmide lagen auch in einem Molekulargrößenbereich, der bisher für Ent-Plasmide beschrieben wurde (Picken et al., 1983; Mul-lany et al., 1983; So et al., 1976)). Für die Herstellung von "Proben" sind aber noch weitere Versuche zur genaueren Identifizierung des Ent-Plasmids bei caninen Stämmen (z.B. Curing- oder Transferversuche) notwendig.

Sowohl plasmidfreie als auch plasmidtragende Stämme hatten die Fähigkeit, Hämolysin zu bilden. Dies deckt sich mit den Erfahrungen aus der Literatur, nach denen die genetische Information für die Hämolysinbildung sowohl auf dem Chromosom als auch extrachromosomal liegen kann (Beutin et al., 1986). Demnach ist auch nicht zu erwarten, daß Hämolysin- und Enterotoxinbildung genetisch gekoppelt sind. Da hämolysinbildende Stämme sehr häufig in Reinkultur isoliert werden, besteht hier eventuell eine Verbindung zu anderen Virulenzeigenschaften. Weiterführende Untersuchungen sind zur Abklärung notwendig.

Man muß sich bei der Interpretation der Ergebnisse davor hüten, von dem Vorkommen der Plasmide bei den meisten E.coli gleichzeitig auf spezielle Virulenzfaktoren Rückschlüsse zu ziehen. Viele Plasmide sind ein physiologischer Bestandteil der E.coli-Keime z.B. Col-Plasmid, F-Faktor oder Plasmide für den Raffinoseabbau. Ein großer Anteil der "kleinen" Plasmide ist Träger der Information für Antibiotika-Resistenzen. Für den vorliegenden Versuchsansatz war es wichtig festzustellen, daß die überwiegende Zahl der E.coli-Stämme ein oder mehrere Plasmide in ganz unterschiedlichen Mustern enthalten. Diese Heterogenität der Plasmidmuster bietet die Basis, die Plasmidanalyse als epidemiologische Methode für weitere Versuche einzusetzen.

Beim Fehlen von Plasmiden oder beim Vorkommen einiger weniger Plasmidmuster wäre dies nicht möglich gewesen.

Unsere Untersuchungen basieren auf Proben aus 38 Familien. Die Auswahl erfolgte einseitig aufgrund des Krankheitsgeschehens (chronischer Durchfall) beim Hund. Leider konnten wir auf dieser Grundlage in einem Zeitraum von 12 Monaten nicht mehr Familien zur Mitarbeit gewinnen, obwohl Durchfallerkrankungen bei Hunden sehr häufig sind. Für zukünftige Untersuchungen sollte der Versuchsansatz umgekehrt erfolgen, d.h. die Zielgruppe sollten Kinder mit Durchfallkrankheiten sein, die engen Kontakt mit Hunden haben. Vielleicht ist es auf diese Weise möglich, mehr und leichter Personen für die Mitarbeit an diesen Untersuchungen zu gewinnen.

Der Versuchsablauf kann in bezug auf die Zahl der zu untersuchenden Einzelkolonien auch vereinfacht werden. Bezugnehmend auf die Erfahrungen von Morris et al. (1976) haben wir von jeder Kotprobe 5 Kolonien zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Morris et al. (1976) halten eine Stichprobenanzahl von 5 Kolonien für notwendig, um mit größtmöglicher Sicherheit eventuell vorhandene ETEC-Stämme zu erfassen. In unseren Versuchen hat sich aber gezeigt, daß in 29 Familien mit insgesamt 116 E.coli-Stämmen sowohl bei den Besitzern als auch bei den Hunden mindestens 4 der 5 isolierten E.coli-Stämme im Plasmidmuster identisch waren. Dies läßt entweder auf eine individuell sehr einheitliche E.coli-Population schließen, oder auf die Abstammung von einem sich gerade in Teilung befindlichen Bakterium. Traten verschiedene Plasmidmuster auf, konnten diese meist aus den ersten 3 E.coli-Stämmen isoliert werden, so daß 2 bis 3 Kolonien eine ausreichende Sicherheit über die Varianz der E.coli-Stämme in einer Kotprobe geben würden.

5. Zusammenfassung

Insgesamt 614 E.coli-Stämme aus Fäzesproben von gesunden und durchfallkranken Hunden sowie von Hundebesitzern wurden auf ihren Plasmidgehalt untersucht. Die Darstellung der Plasmidmuster erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Rund 20% der E.coli-Stämme aus den Kotproben der Hunde und Besitzer waren plasmidfrei. Die übrigen 80% der Stämme hatte bis zu 13 Plasmide, die insgesamt 11 verschiedene Verteilungsmuster aufwiesen. Charakteristische Plasmidmuster für E.coli-Stämme aus gesunden Hunden, durchfallkranken Hunden oder Hundebesitzern konnten nicht nachgewiesen werden.

ETEC-Stämme wurden nur aus kranken Hunden isoliert. Alle diese Stämme besaßen Plasmide. Hämolysinbildende und mucoid wachsende E.coli-Stämme traten in allen drei untersuchten Gruppen auf und waren sowohl plasmidfrei als auch plasmidhaltig.

Beim Vergleich der E.coli-Stämme aus Kotproben von Hunden und den Besitzern konnten in einer Familie beim Kind und beim Hund Stämme mit identischen Plasmidmustern isoliert werden. In 4 anderen Familien stimmten einzelne Plasmide der E.coli-Stämme aus Kotproben des Hundes mit denen der Familienmitglieder überein.

6. Summary

Comparative investigations on the distribution of plasmids in E.coli strains from dogs with diarrhoea, their owners, and healthy dogs.

A total of 614 E.coli-strains taken from the faeces samples of dogs with diarrhoea, their owners, and healthy dogs were examined for plasmid content. The pattern of plasmid sizes was shown by agarose electrophoresis.

About 20% of the E.coli strains tested were free of plasmids. The remaining 80% of the strains had up to 13 plasmids displaying 11 different distribution patterns. Characteristic plasmid size patterns for E.coli strains could not be demonstrated in the three test groups.

ETEC-strains could only be isolated from dogs suffering in diarrhoea. All these strains contained plasmids. Hemolysis forming E.coli strains appeared in each group examined and either contained plasmids or proved to be plasmid-free; same with the mucoid-growing strains.

Comparing the E.coli strains isolated from faeces of dogs and their owners in the case of one family it was possible to isolate strains with identical plasmid patterns from dog and child. In 4 other families, individual plasmids of the E.coli strain from faeces samples of the dog matched those of the family members.

7. Literaturverzeichnis

- BAK A.L., G. CHRISTIANSEN, C. CHRISTIANSEN, A. STENDERUP,
I. ORSKOV, F. ORSKOV, 1972:
Circular DNA molecules controlling synthesis and
transfer of the surface antigen (K88) in *Escherichia*
coli.
J. Gen. Microbiol. 73, 373-385.
- BALDINI M.M., J.B. KAPER, M.M. LEVINE, D.C.A. CANDY, H.W.
MOON, 1983:
Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic
Escherichia coli.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2, 534-538.
- BALJER G., 1985:
Pathogenese, Klinik und Diagnose der wichtigsten
bakteriell bedingten Enteritiden beim Tier.
Tierärztl. Prax. 13, 141-150.
- BALJER G., 1986:
Escherichia coli-Diarrhoe der Saug- und Absatzferkel.
Prakt. Tierarzt 5, 388-393.
- BALJER G., S. CHORHERR, E. SICKEL, D. GIESSEN, 1975:
Orale, aktive Immunisierung neugeborener Ferkel gegen
Escherichia coli; Wirksamkeitsnachweis im
Darmligaturtest.
J. Vet. Med. B 22, 488-498.
- BALJER G., M. SAITO, A. MAYR, 1986:
Nachweis von enterotoxinbildenden *E. coli*-Stämmen
(ETEC) bei Hunden mit akuter Gastroenteritis.
Prakt. Tierarzt 67, 472-477.

BENNETT P., 1985:

Bacterial Transposones.

in: Genetics of Bacteria, SCAIFE J., D. LEACH, A.

GALIZZI, Eds., London New York, Academic Press, 0-12-621180-9, 97-115.

BEUTIN, L., M. MONTENEGRO, S. ZIMMERMANN, R. STEPHAN, 1986:

Characterization of hemolytic strains of *Escherichia coli* belonging to classical enteropathogenic O-serogroups.

Zbl. Bakt. Hyg. A 261, 266-297.

BIRNBOIM H.C., J. DOLY, 1979:

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl. Acid. Res. 7, 8-1513.

BURGESS M.N., R.J. BYWATER, C.M. COWLEY, N.A. MULLAN, P.M.

NEWSOME, 1978:

Biological evaluation of a methanol-soluble, heatstable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves.

Infect. Immun. 21, 526-531.

CLOWES R.C., 1972:

Molecular structure of bacterial plasmids.

Bact. Rev. 36, 361-405.

CRAVIOTO A., S.M. SCOTLAND, B. ROWE, 1982:

Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans.

Infect. Immun. 36, 189-197.

- CRUZ Fd.e. l.a., J.C. ZABALA, J.M. ORTIZ, 1983:
Hemolysis determinant common to *Escherichia coli*
strains of different O serotypes and origins.
Infect. Immun. 41, 881-887.
- DALLAS W.S., D.M. GILL, S. FALKOW, 1979:
Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin.
J. Bacteriol. 139, 850-858.
- DATTA N., M.E. NUGENT, 1984:
Characterization of plasmid in wild strains of
bacteria.
in: *Advanced molecular genetics*, PÜHLER A., K.N.
TIMMIS, Eds., Berlin Heidelberg New York, Springer.
- DEAN A.G., C. CHING, R.G. WILLIAMS, L.B. HARDER, 1972:
Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant
mice: application in a study of diarrhoea in children
in Honolulu.
J. Infect. Dis. 125, 407-411.
- ECHEVERRIA P., J. MURPHY, 1980:
Enterotoxigenic *Escherichia coli* carrying plasmids
coding for antibiotic resistance and enterotoxin
production.
J. Infect. Dis. 142, 273-278.
- ECHEVERRIA P., J. SERIWATANA, D.N. TAYLOR, S.
CHANGCHAWALIT, C.J. SMYTH, J. TWOHIG, B. ROWE, 1986:
Plasmids coding for colonization factor antigens I
and II, heat-labile enterotoxin, and heat-stable
enterotoxin A2 in *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 151, 626-630.
- EVANS D.G., D.J. EVANS, H.L. DUPONT, 1977:
Virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia*
coli.
J. Infect. Dis. 136, 118-123.

- EVANS G., R.P. SILVER, J.D. EVANS, D.G. CHASE, S.L. GORBACH, 1975:
Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans.
Infect. Immun. 12, 656-667.
- FRANKLIN A., O. SÖDERLIND, R. MÖLLBY, 1981:
Plasmids coding for enterotoxins, k88 antigen and colicins in porcine *Escherichia coli* strains of O-group 149.
Med. Microbiol. Immunol. 170, 63-72.
- GAASTRA W., F.Kd.e. GRAAF, 1982:
Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains.
Microbiol. Rev. 46, 129-161.
- GOEBEL W., J. HEDGPETH, 1982:
Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 151, 1290-1298.
- GOEBEL W., B. ROYER-POKORA, W. LINDENMAIER, H. BUJARD, 1974:
Plasmids controlling synthesis of hemolysin in *Escherichia coli*: molecular properties.
J. Bacteriol. 118, 964-973.
- GONZALES E.A., J. BLANCO, 1985:
Relation between antibiotic resistance and number of plasmids in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* strains.
Med. Microbiol. Immunol. 174, 257-265.

- GRAAF F.K. d.e., J. ROORDA, 1982:
Production, purification and characterisation of
fimbrial adhesive antigen F 41 isolated from calf
enteropathogenic *Escherichia coli* strain B 41 M.
Infect. Immun. 36, 751-758.
- GREEN B.A., R.J. NEILL, W.T. RUYECHAN, R.K. HOLMES, 1983:
Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli*
which activates adenylate cyclase in eucaryotic
target cells is not plasmid mediated.
Infect. Immun. 41, 383-390.
- GYLES C., M. SO, S. FALKOW, 1974:
The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*.
J. Infect. Dis. 130, 40-49.
- GYLES L.C., 1977:
Naturally occurring plasmid carrying genes for
enterotoxin production and drug resistance.
Science 198, 198-199.
- HARRIS J.R., D.I. WACHSMUTH, B.R. DAVIS, M.L. COHEN, 1982:
High-molecular-weight plasmid correlates with
Escherichia coli enteroinvasiveness.
Infect. Immun. 37, 1295-1298.
- HELMUTH R., R. STEPHAN, C. BUNGE, B. HOOG, A. STEINBECK, E.
BULLING, 1985:
Epidemiology of virulence-associated plasmids and
outer membrane protein patterns within seven common
Salmonella serotypes.
Infect. Immun. 48, 175-182.
- HOMANN A., M.R. WILSON, 1975:
Adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to
intestinal epithelium in vivo.
Infect. Immun. 12, 866-880.

- JOSSE M., E. JACQUEMIN, A. KAECKENBEECK, 1980:
Presence chez le chien, d'*Escherichia coli*
productrices d'une enterotoxine thermostable (STa).
Ann. Méd. Vét. 124, 211-214.
- KLIPSTEIN F.A., B. ROWE, R.F. ENGERT, H.B. SHORT, R.J.
GROSS, 1978:
Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of
Escherichia coli isolated from infants with epidemic
diarrhea.
Infect. Immun. 21, 171-178.
- LEBECK G., 1975:
Die infektiöse (plasmidische) bakterielle
Antibiotikaresistenz.
Internist 16, 416-427.
- LEE G.H., S.L. MOSELEY, H.W. MOON, S.C. WHIPP, C.L. GYLES,
M. SO, 1983:
Characterization of the gene encoding heat-stable
toxin II and preliminary molecular epidemiological
studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-
stable toxin II producers.
Infect. Immun. 42, 264-268.
- LEVINE M.M., 1987:
Escherichia coli that cause diarrhea:
enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive,
enterohemorrhagic, and enteroadherent.
J. Infect. Dis. 155, 377-389.
- LEVINE M.M., E.J. BERGQUIST, D.R. NALIN, D.H. WATERMANN,
R.B. HORNICK, C.R. YOUNG, S. SOTMANN, B. ROWE, 1978:
Escherichia coli-strains that cause diarrhea but do
not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins
and are not-invasive.
Lancet 1, 1119-1122.

LEVINE M.M., J.P. NATARO, H. KARCH, M.M. BALDINI, J.B. KAPER, R.E. BLACK, M.L. CLEMENTS, A.D. O'BRIEN, 1985:
The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor.

J. Infect. Dis. 152, 550-559.

LEVINE M.M., M.B. RENNELS, V. DAYA, T.P. HUGHES, 1980:
Hemagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea.

J. Infect. Dis. 141, 733-737.

MADDOX C.W., A. WILSON, 1986:
High technology diagnostics: detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*, using DMA probes.
J. Am. Vet. Med. Ass. 188, 57-59.

MANSSON I., 1962:
Hemolytic *Escherichia coli* serotypes isolated from pigs, cattle, dogs and cats.
Acta. Vet. Scand. 3, 65-78.

MATHEWSON J.J., P.C. JOHNSON, H.L. DUPONT, T.K. SATTERWITE, D.K. WINDSOR, 1986:
Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers.
J. Infect. Dis. 154, 524-527.

MCCONNELL M.M., H.R. SMITH, G.A. WILLSHAW, S.M. SCOTLAND, B. ROWE, 1980:
Plasmids coding for heat-labile enterotoxin production isolated from *Escherichia coli* 078: comparison of properties.
J. Bacteriol. 143, 158-167.

- MEYERS J.A., D. SANCHEZ, L.P. ELWELL, S. FALKOW, 1976:
Simple agarose gel electrophoretic method for the
identification and characterization of plasmid
deoxyribonucleic acid.
J. Bacteriol. 127, 1529-1537.
- MINTON N.P., J. MARSH, T. ATKINSON, 1983:
The r-factors of multiple antibiotic resistant faecal
coliforms isolated from a domestic dog.
J. Appl. Bacteriol. 55, 445-452.
- MOOI F.R., F.K.d.e. GRAAF, 1985:
Molecular biology of fimbriae of enterotoxigenic
Escherichia coli.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 118, 119-138.
- MOON H.W., B. NAGY, R.E. ISAACSON, 1977:
Intestinal colonization and adhesion by
enterotoxigenic Escherichia coli: ultrastructural
observations on adherence to ileal epithelium of the
pig.
J. Infect. Dis. 136, 124-129.
- MOON H.W., S.C. WHIPP, R.A. ARGENZIO, M.M. LEVINE, R.A.
GIANNELLA, 1983:
Attaching and effacing activities of rabbit and human
enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit
intestines.
Infect. Immun. 41, 1340-1351.
- MORRIS G.K., M.H. MERSON, D.A. SACK, J.G. WELLS, W.T.
MARTIN, W.E. DEWITT, J.C. FEELEY, B.R. SACK, D.M.
BESSUDO, 1976:
Laboratory investigation of diarrhea in travellers to
Mexico: evaluation of methods for detecting
enterotoxigenic Escherichia coli.
J. clin. Microbiol. 3, 486-495.

- MOSELEY S.L., M. SAMADPOUR-MOTALEBI, S. FALKOW, 1983:
Plasmid association and nucleotide sequence
relationships of two genes encoding heat-stable
enterotoxin production in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 156, 441-443.
- MULLANY P., A.M. FIELD, M.M. MCCONNELL, S.M. SCOTLAND, H.R.
SMITH, B. ROWE, 1983:
Expression of plasmids coding for colonization factor
antigen II (CFA/II) and enterotoxin production in
Escherichia coli.
J. Gen. Microbiol. 129, 3591-3601.
- MÜLLER D., C. HUGHES, W. GOEBEL, 1983:
Relationship between plasmid and chromosomal
hemolysin determinants of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 153, 846-851.
- NATARO J.P., I.C. SCALETSKY, J.B. KAPER, M.M. LEVINE, L.R.
TRABULSI, 1985:
Plasmid-mediated factors conferring diffuse and
localized adherence of enteropathogenic *Escherichia*
coli.
Infect. Immun. 48, 378-383.
- NOEGEL A., U. RDEST, W. GOEBEL, 1981:
Determination of the functions of hemolytic plasmid
gHly 152 of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 145, 233-247.
- NOVICK R.P., 1980:
Plasmide.
Spektrum d. Wissenschaft, 35-51.

NOVICK R.P., R.C. CLOWES, S.N. COHEN, R. CURTISS III, N. DATTA, S. FALKOW, 1976:

Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal.

Bact. Rev. 40, 168-189.

O'BRIEN A.D., G.D. LAVECK, 1983b:

Purification and characterization of *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 40, 675-683.

O'BRIEN A.D., G.D. LAVECK, M.R. THOMPSON, S.B. FORMAL, 1982:

Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*.

J. Infect. Dis. 146, 763-769.

O'BRIEN A.D., T.A. LIVELY, T.W. CHANG, S.L. GORBACH, 1983a:

Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O 157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis.

Lancet 2, 573 .

OLSON P., Å. HEDHAMMAR, A. FARIS, K. KROVACEK, T. WADSTRÖM, 1985:

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs with diarrhoea.

Vet. Microbiol. 10, 577-589.

OLSON P., Å. HEDHAMMAR, T. WADSTRÖM, 1984:

Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in two dogs with acute diarrhea.

J. Am. Vet. Med. Ass. 184, 982-983.

PICKEN R.N., A.J. MAZAITIS, W.K. MAAS, M. REY, H. HEYNEKER,
1983:

Nucleotide sequence of the gene for heat-stable
enterotoxin II of *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 42, 269-275.

RICHTER T.H., E. HELLMANN, 1985:

Vorkommen und Eigenschaften enterotoxinbildender
Escherichia coli-Stämme beim enteritiskranken
Junghund.

J. Vet. Med. B 32, 446-453.

RIEß G., A. PÜHLER, 1984:

Mobilization of host chromosomal genes and vector
plasmids in *E.coli* by the p-type plasmid R68.45.

in: Advanced molecular genetics, PÜHLER A., K.N.

TIMMIS, Eds., Berlin Heidelberg New York, Springer,
51-63.

ROTHBAUM R.A., J. MCADAMS, R. GIANNELLA, J.C. PARTIN, 1982:

A clinicopathologic study of enterocyte-adherent
Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in
infants.

Gastroenterol. 83, 441-454.

SACK R.B., 1980:

Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and
characterization.

J. Infect. Dis. 142, 279-286.

SANTOS D.S., S. PALCHAUDHURI, W.K. MAAS, 1975:

Genetic and physical characteristics of an
enterotoxin plasmid.

J. Bacteriol. 124, 1240-1247.

- SCALETISKY I.C.A., M.L.M. SILVA, L.R. TRABULSI, 1984:
Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic
Escherichia coli to Hela cells.
Infect. Immun. **45**, 534-536.
- SILVA M., M. LOURDES, I.C. SCALETISKY, H.M. REIS, H.M.
ALFONSO, L.R. TRABULSI, 1983:
Plasmid coding for drug resistance and production of
heat-labile and heat-stable toxins harbored by an
Escherichia coli strain of human origin.
Infect. Immun. **39**, 970-973.
- SMITH H.R., S.M. SCOTLAND, B. ROWE, 1983:
Plasmids that code for production of colonization
factor antigen II and enterotoxin production in
strains of *Escherichia coli*.
Infect. Immun. **40**, 1236-1239.
- SMITH H.R., G.A. WILLSHAW, B. ROWE, 1982:
Mapping of a plasmid, coding for colonization factor
antigen I and heat-stable enterotoxin production,
isolated from an enterotoxigenic strain of
Escherichia coli.
J. Bacteriol. **149**, 264-275.
- SMITH H.W., M.A. LINGGOOD, 1972:
Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins
with particular regard to those produced by atypical
piglet strains and by calf and lamb strains: the
transmissible nature of these enterotoxins and of K
antigen possessed by calf and lamb-strains.
J. Med. Microbiol. **5**, 243-250.

- SO M., H.W. BOYER, M. BETLACH, S. FALKOW, 1976:
Molecular cloning of an *Escherichia coli*-plasmid determinant that encodes for the production of heatst
J. Bacteriol. 128, 463-472.
- SO M., W.S. DALLAS, S. FALKOW, 1978:
Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant.
Infect. Immun. 21, 405-411.
- THOMAS L.V., A. CRAVIOTO, S.M. SCOTLAND, B. ROWE, 1982:
New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans.
Infect. Immun. 35, 1119-1124.
- WELCH R.A., R. HULL, S. FALKOW, 1983:
Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 42, 178-186.
- WILLSHAW A.G., H.R. SMITH, M.M. MCCONNELL, E.A. BARCLAY, J. KRUIJLAC, B. ROWE, 1982:
Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heatstable enterotoxin in several *Escherichia coli* serotypes.
Infect. Immun. 37, 858-868.
- WOOD P.K., J. GLENN, J.R. MORRIS, P.L.C. SMALL, O. SETHABUTR, M.R.F. TOLEDO, L. TRABULSI, J.B. KAPER, 1986:
Comparison of DMA probes and the sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains.
J. clin. Microbiol. 24, 498-500.

8. Anhang

Übersicht über die verwendeten Lösungen, Nährböden und Substanzen

Name des Mediums	Zusammensetzung	(Firma)	Herstellung
LB-Nährlösung	10 g NaCl 10 g Caseinhydrolysat 5 g Yeast extract	(Merck) (") (Difco)	In 1000 ml A.dest. lösen, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Lysozym-Lsg.	20 mg Lysozym 90 mg Glucose	(Sigma) (Merck)	In 10 ml TE-Puffer lösen (immer frisch ansetzen)
TE-Puffer	6,06 g Tris-acetat 3,72 g EDTA	(Serva) (")	In 100 ml A.dest. lösen, auf pH 8,0 einstellen
SDS 1%	0,1 g Natriumdodecylsulfat	(Sigma)	In 10 ml 0,2 N NaOH lösen und steril filtrieren.
Natriumacetat 3 M, pH 4,8	81,65 g Na-Acetate-Trihydrat	(Merck)	In 100 ml A.dest. lösen, mit Eisessig auf pH einstellen und mit A.dest. auf 200 ml auffüllen.
Natriumacetat 0,1 M, pH 7,4	1,36 g Na-Acetate-Trihydrat	(Merck)	In 100 ml TE-Puffer lösen.
Ribonuclease 20x	10 mg Ribonuclease	(Boehringer)	In 1 ml TE-Puffer lösen. Vor Gebrauch 1:20 verdünnen = 0,025 mg/Probe

Name des Mediums	Zusammensetzung	(Firma)	Herstellung
BSE-Puffer	0,025 g Brompheno l blau 5,0 g Sucrose 0,5 g SDS 186,1 g EDTA	(Sigma) (Serva) (Sigma) (Serva)	In 10 ml A.dest. lösen, vor Verwendung 2x aufkochen.
Elektrophoresepuffer 50x	242,4 g Tris-Acetat 34,02 g Na-Acetat-Trihydrat 18,6 g EDTA	(Serva) (Serva)	(Merck) In 1000 ml A.dest. lösen, vor Gebrauch auf 1x verdünnen.
Agarose 1 0,4 %	0,8 g Agarose	(Seakem)	In 200 ml 1x Elektrophorese-Puffer lösen.
Weißherbst-Färbung	10 mg Ethidiumbromid	(Sigma)	In 1 ml A.dest lösen. Die Stammlösung vor Gebrauch 1:100 mit A.dest. verdünnen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr möchte ich mich an dieser Stelle, für die Überlassung des Themas und den mir freundlicherweise zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, sowie sein stetes Interesse an meiner Arbeit, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer gilt mein besonderer Dank für die Betreuung der Arbeit und die wissenschaftliche Anleitung.

Bei Herrn Dr. Schels Baron von Keßling bedanke ich mich für wertvolle Hinweise.

Herrn Dr. Hübert sei herzlich für die Einarbeitung in die Molekularbiologie und die mir jederzeit gewährte Beratung gedankt.

Bei Frau Scholin und Frau Gerber möchte ich mich für ihre Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima bedanken, sowie bei allen Angehörigen des Institutes, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

4. 5. 1958	geboren als Tochter von Anton und Ursula Wastlhuber in München
1964 - 1969	Grundschule in München
1969 - 1975	Neusprachliches Gymnasium Frauenchiemsee
1975 - 1978	Gymnasium Hohenschwangau
Juni 1978	Abitur
1978 - 1979	landwirtschaftliches Praktikum in Weisham
1979 - 1980	Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim
1980 - 1985	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Februar 1986	Approbation als Tierärztin
März 1986	Beginn der vorliegenden Dissertation

HERSTELLUNG

profi

druck GmbH

Adalbertstraße 10 RG
8000 München 40

Tel: 39 07 27

